

## 目次

### 環境

未来の福祉をデザインする ～仮想将来世代との対話から導く日本の明日～ .....	1
	芦田航一 太田実遊花 西村春香
京都市の「いのちの森」と「糺の森」における成木と実生の毎木調査 ～京都から考える都市林の未来～ .....	4
	梅澤凌我 原田周典 安岡由都
「京都」をつくる ～京都文化の持つ地域性が育む街並み～ .....	10
	川西零陽 須磨由菜 谷淳至 本部紬
「京都人」と外国人観光客とのマナー意識の違い ～観光と生活が調和する街・京都を目指して～ .....	15
	中村有沙 野上駿介 三井有唯 南穂乃花

### 数学

非自然数階微分の定義について .....	20
	浅野青
実数階微分について .....	25
	岡優太郎 伏見宗紘
三次元における反転と図形アルベロスについて .....	30
	東谷仁
判別分析法による二値化画像及びエッジ抽出画像を用いたサポートベクトルマシン(SVM)による表情認識 ～コンピュータに自動で笑顔かどうかを判別させる～ .....	34
	安岡里都
“洗濯機”の流れを考える ～軸対称回転流モデルの利用～ .....	40
	清水花音
超音波による雨粒の除去 ～ワイパーに代わる超音波のポテンシャル～ .....	45
	高木恒佑
成長する AI ～重力付き四目並べにおける盤面評価の違いによる AI の挙動の変化～ .....	48
	尾上礼音

### 生物

肥料職人！ ～カイワレダイコンから探る肥料吸収～ .....	51
	阿部結子 後藤優和 廣瀬奈穂美
ゼブラフィッシュの行動観察 .....	56
	飯田龍成 武田錦二郎 吉田和真
シロアリ誘引剤を作る ～ドクダミを用いた環境に優しい防除～ .....	60
	田邊裕紀 椎村響 山地夏鈴

なぜ院内感染がおこるのか？ ～大腸菌培養による薬剤耐性の解明～ .....	66
	内田那々子 中川隆乃介 中野勇輝
植物性乳酸菌で腸内環境を変える～京漬け物の魔法～ .....	70
	秋間友莉子 浅田美紅
ゼブラフィッシュの左右記憶力 ～T字路実験による検証～ .....	75
	古仲達貴 佐々木友希 清水陽華莉
安いお肉を柔らかく！？ ～電気泳動で見るタンパク質分解酵素の力～ .....	80
	上田有希 大橋歩実 三木凜音
蚊の繁栄を防ぐ方法 ～ボウフラの pH 耐性 ～ .....	86
	井之川慎 喜多恭平 後藤健太郎

## 物理地学

副虹を探そう ～水の代用品 ガラスビーズを用いて～ .....	89
	強田亜美加 志波穂の花 芳井真穂子
太陽風からエネルギーを取り出す ～コイルを用いた誘導電流の検知～ .....	92
	大西翔太 新見渉 藤井信 和木隆浩
最高の建築 ～ハニカム構造は強いのか～ .....	98
	池田圭吾 菅原葵 太口悠里 中澤翔
食塩を用いたアミドによる媒晶作用の検証 ～ダイヤ型の食塩を作る～ .....	101
	笹田翔太 福井創
ヤマトシジミ貝殻の形態と生育環境 .....	106
	安達夏葵 金田わかな 南條絢音

## 化学

納豆由来の PGA を用いた水質浄化 .....	109
	川上智大 田辺みゆ 森康平
身近な食材で菌を撃退 ～辛味・香り成分による殺菌・抗菌効果～ .....	112
	東さくら 北田絢音 黒田良介 崎山美穂
宇宙で使える人工土をつくる ～発泡ウレタンによる植物の栽培～ .....	116
	浅居湧登 奥村真央 内藤瑠璃 牧野茜
エステルの組み合わせでつくる果物の香り .....	122
	澤坂綾乃 前田菜緒 向園愛花
カテキンとビタミン C の抗酸化作用には相乗効果があるのか ～Synergistic Antioxidant Effects between Catechins and VitaminC ～ .....	126
	小笹右登 小椋友菜 寺田優惟

# 肥料職人！

## ～ カイワレダイコンから探る肥料吸収 ～

阿部結子 後藤優和 廣瀬奈穂美

### 要旨

本研究では、ダイコン(カイワレダイコン)の肥料(無機塩類)吸収について知るために肥料となる物質の組み合わせを変えて成長を観察する実験を行った。その結果、我々の実験では、一度の肥料ではN:P:K:B:Mg:Ca=400:266:400:5:40:3(mol比)の割合での配合が適していることがわかった。また、窒素とカルシウムには成長促進の相乗効果があることも確かめられた。

### 1. はじめに

植物の肥料の中で窒素、リン、カリウムが三大要素といわれている。また肥料の量によって図1のような反応が見られることが知られている。

	欠乏	過剰
窒素	葉の色が薄くなる	葉の色が濃くなる
リン	生育が悪くなる	
カリウム	葉がしわになる	
ホウ素	葉の先が黄化	下位葉から黄化
マグネシウム	葉脈間が黄化	
カルシウム	葉の先が黄化	

図1. 肥料の欠乏時、過剰時の反応 [2]

そこで本実験では予備実験として、三大要素に加えてホウ素、塩素、マグネシウム、カルシウムを図2のように組み合わせて、シロイヌナズナを栽培した。それらを長さ、色、大きさと言った観点で観察した。肥料の物質間には、相乗効果と拮抗効果があり、相乗効果とは互いに効果を促進する効果のことで、拮抗効果とは互いに効果を打ち消し合う効果のことである。

①硝酸カリウム  $\text{KNO}_3$  0.2mmol

②リン酸二水素ナトリウム二水和物

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.133mmol

③ホウ酸  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.0025mmol

④塩化ナトリウム  $\text{NaCl}$  0.005mmol

⑤塩化マグネシウム  $\text{MgCl}_2$  0.02mmol

⑥塩化カルシウム  $\text{CaCl}_2$  0.015mmol

	①	②	③	④	⑤	⑥
A	○	○				
B	○	○	○			
C	○	○		○		
D	○	○			○	
E	○	○				○
F	○	○	○	○		
G	○	○	○		○	
H	○	○	○			○
I	○	○		○	○	
J	○	○		○		○
K	○	○			○	○
L	○	○	○	○	○	
M	○	○	○	○		○
N	○	○	○		○	○
O	○	○		○	○	○
P	○	○	○	○	○	○

(6月22日時点で、成長の大きく成長しているものから順に、O, C, D, L, K, N, I, P, G, F, E, H, A, B, M, Jであった。)

図2. 予備実験の肥料詳細

その結果Jの成長が悪かった。Jは①と②以外に④と⑥が入っていたことから④と⑥の間には拮抗作用があるのではないかと考えられる。よって本実験では④と⑥が入っているものに絞って実験を行うこととなった。また今回の本実験では、予備実験でのシロイヌナズナの育成の難しさを踏まえて、同じアブラナ科のダイコンを用いて行うこととなった。

## 2. 材料・研究方法

### 2-1. 研究試料

本研究で用いたダイコンの種子は、アメリカ原産(宇都宮市東町 309 番地, トーホク株式会社)のものを使用し, ロックウールを用いて水耕栽培した. 水はイオン交換水を用いた. 加える肥料として, 硝酸カリウム, リン酸二水素ナトリウム二水和物, ホウ酸, 塩化マグネシウム二水和物, 塩化カルシウム, 塩化ナトリウムを用いた. また, ハイポネックス液 6-10-5 を用いた. 栽培は人工気象器(日本医科器械, LH-220N)を用い, 11L13D, 照度 2000 ルクスで行った.

### 2-2. 研究方法

#### 2-2-1. 実験 1

ダイコンの種子をロックウール(大和プラスチック株式会社)に植えてからイオン交換水を与え, 一週間人工気象装置の中で育てて発芽させた. その中から成長具合が同じぐらいのものを 48 個選び, 3 個ずつプラスチック容器に入れて, A, C, E, J, M, O, P, Q, A', C', E', J', M', O', P', Q' と命名した. 肥料には硝酸カリウム, リン酸二水素ナトリウム二水和物, ホウ酸, 塩化ナトリウム, 塩化マグネシウム, 塩化カルシウムの 6 種類の物質を用意し, 硝酸カリウムとリン酸二水素ナトリウムは H 以外のすべてに, ホウ酸は M と P に, 塩化ナトリウムは C, J, M, O, P に, 塩化マグネシウム O と P に, 塩化カルシウムは E, J, M, O, P に入れた. Q には 2000 倍に希釈したハイポネックス溶液を入れた. A'~Q'にはそれぞれ 1.3 倍の肥料を入れた. 実験は三回行った.

#### 2-2-2. 実験 2

実験 1 の結果を受け, ダイコンの成長に, カルシウムの量が影響を与えるのではないかと考え, カルシウム量を三段階に設定して実験を行った. 実験 1 と同じ量の硝酸カリウム, リン酸二水素ナトリウム二水和物, ホウ酸, 塩化マグネシウム二水和物をすべてにいれ, 塩化カルシウムを, 実験 1 の

0.5 倍(0.0075mmol), 同量(0.015mmol), 2.0 倍の量(0.03mmol)の三段階比較した. また, 実験 1 と異なり, ダイコンは種を植え付けてから約 1ヶ月後に前述のように肥料を入れ, その後 2 週間に一回, 同様に肥料を入れた. 一つの容器の中に三つずつダイコンを入れ, カルシウムの濃度の段階ごとに 5 つずつの容器で実験を行った.

## 3. 結果

### 3-1. 実験 1

実験 1 の結果は図 3 のようになった. 1.3 倍のものと 1 倍のものの差について, 全体として 1.3 倍のものの方が大きく成長していた. 特に J においてその傾向が顕著であった. A ではその差は小さく, M ではほとんど同じ大きさであった. また, P においては 1 倍のものの方が大きく成長していた. 葉の状態について, A は色が薄く先が黄色で, C は色が薄く, E はしわがあり, J はきれい, M, O, P は色が濃く反っており, 特に P において顕著であった. また, P は葉の先が黄色かった. Q はしわがあつて色が濃く先が黄色であった. 植物の体の大きさについて, J が大きく, E, O, Q は小さかった. なお, 先が黄色の葉とは図 5, 色が薄い葉とは図 6, 色が濃い葉とは図 7, しわのある葉とは図 8, そっている葉とは図 9 のような葉を指す.

	A	C	E	J	M	O	P	Q
1倍と1.3倍の差	小			大	極小		1倍が大	
葉キレイ→○ シブシブ→×			×	○				×
葉の色が濃く 反っている					○	○	○ 特に	
大きさ			小	大		小		小
色が薄い	○	○						× 濃い
葉の先が黄色	○						○	○

図3 実験1の結果のまとめ

### 3-2. 実験 2

図 4 より 0.5 倍のものよりも 1.0 倍, 2.0 倍と大きくなるにつれて葉の状態はよくなり, 濃い葉の量も増えている.

葉の色の変化は1.0倍が少ない。葉は0.5倍のもの、1.0倍のもの、2.0倍のものもすべて約90枚ずつであった。0.5倍は図10、1.0倍は図11、2.0倍は図12のようになった。

	葉の先の色の 変化の枚数	葉のしわ	濃い葉
0.5倍	12枚	多い	22枚
1.0倍	10枚	ある	31枚
2.0倍	15枚	ほとんどなし	38枚

図4 実験2の結果のまとめ

## 4. 追加実験

### 4-1. 方法

実験2を終えて、実験2と同様の0.5倍、1.0倍、2.0倍のものをそれぞれ①2週間に1回肥料を与えるものと②最初に1度与えて放置するものに分けて肥料吸収頻度を測る実験を3週間行った。

### 4-2. 結果

②のものは①のものと比べて黄色の葉が多く見られた。

### 4-3. 考察

②は栄養が足りていないとわかる。つまり「2週間に1回肥料を与える」という肥料頻度は適切だとわかる。

## 5. 考察

### 5-1. 実験1

全体的にしわしわした葉が多いことから、欠乏するとこの症状が見られるカリウムが足りていないと考えられる。また肥料濃度を1.3倍にしたものの方がそのままのものより大きく成長していたことから、前者がより適量に近いと考えられる。しかし、Pの場合は明らかに1.3倍にしたものの方が小さく、Pにはすべての物質を入れたために、イオン濃度が高すぎたのではないかと考えた。この実験をするにあたり私たちが予想していた、塩化ナトリウム

と塩化カルシウムの間には拮抗効果があるのではないかということについて、この実験結果からはCやEよりJの方が成長していることから明らかな拮抗効果はないと考えられる。図3を見るとAとCには色の薄い葉が見られたことがわかるが、これは、AとCには肥料としてカルシウムを加えていないことをふまえると、窒素とカルシウム間に相乗効果があることが原因ではないかと考えられたため、窒素とカルシウムの相乗効果について実験2を行った。

## 5-2. 実験2

葉の色が濃くなる理由は、窒素の吸収量が影響していると考えられる[2]。また、結果からカルシウム濃度が高くなるにつれて、色の濃い葉の割合が増加している。このことから、カルシウムの濃度が窒素の吸収を促進していると考えられる。葉の先が黄色くなる現象は、カルシウムの吸収量に左右されるということがわかる[2]。結果によると、葉の先が黄色くなっている葉の割合はカルシウム濃度が1.0倍であるものが最も少ない。このことから、カルシウムの適切な濃度は1.0倍のものが最も近いと考えられる。葉のしわの量にはカリウムが大きく影響を与えることがわかっている[2]。結果から、カルシウム濃度1.0倍のものと0.5倍のものとで葉のしわが多い。このことから、カリウムの吸収が2.0倍のものとで最もよかったと考えられ、カルシウムにはカリウムの吸収を促進する効果があると考えられる。

## 6. まとめと今後の課題

ダイコンでは、カルシウムと窒素の間には相乗効果があることが確かめられた。また、一度の肥料では  $N:P:K:B:Mg:Ca=400:266:400:5:40:3$  (mol) が適切であると考えられる。

そのため今後肥料を市販で買うことがあるのなら、微量必須元素ではあるがカルシウムがしっかり入っているものを買うべきだ。

実験 2 で黄化する葉が多く見られたのは、肥料過剰が原因である可能性も考えられるので、植物が肥料を吸収する速度も今後考えていく必要がある。そのためにも今後はイオンメーターを用いて肥料中のイオン濃度を適量に保てるようにする必要がありとえられる。

## 7. 参考文献

- 寺島一郎, 2009~2013, 植物生態学, 分子生理学コンソーシアムによる陸上植物の CO<sub>2</sub>応答の包括的解明
- [2]鈴木正彦, 2012, 農学基礎シリーズ 園芸学の基礎 社会法人農山漁村文化協会 110, 114
- 洗 幸夫, 2015, BSI 生物科学研究所,  
<http://bsikagaku.jp/f-knowledge/knowledge31.pdf>

## 8. 添付資料



図5. 先が黄色の葉



図6. 色が薄い葉



図7. 色の濃い葉



図8. しわのある葉



図9. そっている葉



図10. 0.5倍の様子



図11. 1.0倍の様子



図12. 2.0倍の様子

# ゼブラフィッシュの行動観察

飯田龍成 武田錦二郎 吉田和真

## 要旨

この実験はゼブラフィッシュの行動観察である。ゼブラフィッシュがどのような刺激に反応して行動選択を行っているのか給餌をとおして知ろうと試みた結果、数々の行動パターンを発見することができた。

## 1. はじめに

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は、コイ目コイ科ラスボラ亜科に属する、インドのバングラデシュ原産の熱帯魚である。胴体部に縞が2, 3本ある。飼育が容易かつ繁殖能力が高いためから実験用として扱われやすい生物である。

人間に長期間飼育されている生物は餌を予感して行動するように見える。我々はゼブラフィッシュを用いて、その行動を確認できるかどうか、確認できた場合は具体的にどの刺激に反応しているのかを検証するために実験を行った。

我々は5月から9月上旬まで実験水槽（後述）の左側の区画に餌を与え続けた。予備実験では、我々が餌を与えるときには既に左の区画に移動しており、その後与えられた餌をよく食べる個体を確認、それらの個体を「餌はつねに左の区画に与えられる」という水槽のルールを学習した個体とした。

予備実験でゼブラフィッシュが餌を予感するようになるという事実を確認した。この結果をふまえ、我々は本実験においてゼブラフィッシュが餌を予感するきっかけを調べた。

我々は餌が左の区画で与えられることを学習したゼブラフィッシュ4個体に普段通り餌を与え、その様子を撮影することでどのタイミングでゼブラフィッシュが餌を予感している

のか観察した。

## 2. 材料・研究方法

### 2-1. 研究試料

研究を行うために、専用の飼育水槽を準備した。幅30cmの水槽を、黒く着色した板で二区画に分け、その仕切り板の中央に直径4cmの円形の穴を開けた。左の区画は幅10cm、右の区画は幅20cmとなるようにした（図1）。さらに、ゼブラフィッシュが区画を判別しやすいようにするため、水槽の左側面及び左区画の奥の面に白の画用紙を、右側面及び右区画の奥の面に紫の画用紙を貼った。

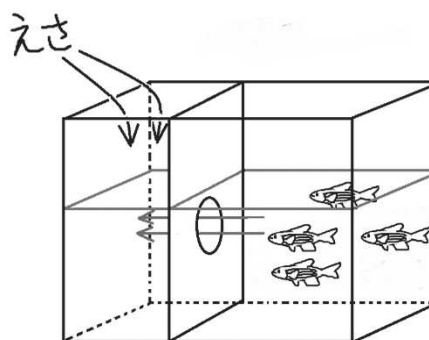


図1 実験水槽の模式図

本実験には、予備実験で「餌はつねに左の区画に与えられる」という水槽のルールを学習したとみなしたゼブラフィッシュ4個体を使用した。



## 2-2. 研究方法

行動観察と実験を行った。行動観察は、目視およびビデオ撮影により行った。実験は以下の手順で行った。

実験水槽から 3.8m の所にカメラを設置した。直前の刺激による影響を排除するため、ゼブラフィッシュをそのまま 10 分間放置した。その後、餌を与える人間が水槽の設置されている実験室の扉をあける前後、水槽に接近している間、水槽のふたを開ける瞬間、給餌の瞬間にそれぞれ二枚ずつ写真を撮った。この実験を 9 月下旬、10 月下旬、11 月下旬の 3 期に亘って行った。11 月下旬の実験において、全個体が実験水槽の左の区画に留まるという行動が見られたので、右に餌を与える実験を同様の手順で行った。

## 3. 結果

### 3-1. 実験の結果

9/21—ポンプの水流を避けて区画を移動した。移動するまでの時間には差があるものの、10 分以内に全個体が移動した。

9/22 朝—実験開始時にすべての個体が右にいた。実験開始から 4、5 分で準備室の扉が開閉し（アクシデント）、このとき 3 個体が左へ移動した。その後 1 個体が右に戻り、実験開始から 10 分後の扉では 2 個体が左に移動するも 1 個体はすぐに右に戻った。蓋を取り外すときに左の 3 個体が水面近くに集まった。餌をやると 1 個体が左に移動し、全個体が餌を食べた。

9/22 昼—アクシデントで実験室の扉が開閉し、その直後 3 個体が左にいた。その後 1 分以内に 2 個体は右に戻った。その後何度かアクシデントにより実験室の扉が開閉するが、無反応だった。実験開始から 10 分後の扉の開閉にも反応せず、蓋を取り外しても反応しなかった。餌をやってから 1 分 30 秒後に 2 個体が左に移動するが、あまり食べずに戻った。

9/25 朝—実験開始時に 4 個体が左にいた。蓋を取り外すと全個体が水面近くに集まった。

全個体が餌を食べた。

9/25 昼—扉を開けたままで実験を行った。実験開始前、近くに人がいて騒がしかった。人の動きひとつひとつには反応しなかった。このとき 2 個体が左にいた。実験開始から 10 分後、3 個体が左にいたが、その後 1 個体が右に移動した。全個体が蓋には反応せず、左の 2 個体だけが餌を食べた。

9/28—活発に泳ぎ回り、区画間の移動も多かった。ほかの個体を積極的に追う個体を確認した。1 個体は左の区画の底を定位置にしてあまり動かなかった。

10/24—全体的にやせ細ってしまっていた。扉を開ける 6 分前に 1 個体が左に、3 個体が右にいた。その後 1 個体が左に移動した。扉の開閉には無反応だった。蓋を取り外すと左右両方の個体が水面近くに寄ってきた。（不思議なことに、餌が与えられていない右の区画にいる個体も水面近くに寄ってきた。これまでは右の個体は餌に無関心だった。）

10/25—廊下が騒がしかった。実験開始時に 2 個体が左にいた。扉の開閉には無反応だが、盛んに左右を行き来していた。

10/26 朝—実験開始時に 3 個体が左にいた。扉の開閉にも、蓋を取り外しても無反応だった。餌をやるとすぐに 1 個体が左に移動し、しばらくすると全個体が餌を食べた。なわばりを主張する個体を確認した。

10/26 昼—実験開始前、実験室は騒がしかった。実験開始時に 4 個体が左におり、その後のすべての刺激に反応しなかった。

10/27—実験開始時に 1 個体が左に。そのあとのすべての刺激に反応しなかった。

11/17—実験開始前の約 20 分間は騒がしかった。実験開始時に 3 個体が左におり、扉の開閉によって 1 個体が左に移動し、全個体が餌を食べた。

11/21—実験開始時に 4 個体が左にいた。餌は食べた。

11/24—全個体がずっと左にいた。餌は食べた。

11/27—実験開始時に 4 個体が左にいた。人が接近中に 1 個体が右に移動し、移動した 1 個体を除くすべての個体が餌を食べた。

11/28—全個体がずっと左にいた。餌は食べた。

11/29—実験開始時に 4 個体が左にいた。1 個体が時々右に移動した。餌を食べた。

11/30—全個体がずっと左にいた。餌は食べた。

12/1—全個体がずっと右にいた。餌は食べなかった。

12/5—全個体がずっと左にいた。蓋を取り外すと

12/6—全個体がずっと左にいた。餌を与えても水面に上がってこなかった。

12/7—全個体がずっと左にいた。人影に反応して水面に上がってくるようにも見えたが餌は食べなかった。

12/8—全個体がずっと左にいた。餌は食べなかった。

12/11—全個体がずっと左にいた。餌は食べなかった。

結果を以下の表にまとめた。なお※は、ゼブラフィッシュが蓋の取り外しによって水面に寄ったことを示す。

実験日	実験開始時	扉(アクシデント)	扉	接近中	蓋	給餌
9/22 朝	0	0→3	2→4	4→3	※	3→4
9/22 昼	?	?→3				1→3
9/25 朝	4				※	
9/25 昼	2					
10/24	2				※	
10/25	2					
10/26 朝	3					3→4
10/26 昼	4					
10/27	1					
11/17	3		3→4			
11/21	4					
11/24	4					
11/27	4			4→3		
11/28	4				※	
11/29	4					
11/30	4					
12/1	0					
12/5	4				※	
12/6	4					
12/7	4					
12/8	4					
12/11	4					

図 2 刺激の前後における左区画にいるゼブラフィッシュの個体数

#### 4. 考察

9 月、10 月、11 月それぞれわけて考察を報告する。なぜなら、それぞれの期間ごとにゼブラフィッシュの示した反応が全く違ったからである。

##### [9 月]

一見、ゼブラフィッシュは扉の開閉をきっかけとして餌を予感しているようだったが、実験中のアクシデントを含めてゼブラフィッシュが区画を移動した時の刺激の共通点を探すと、最初の刺激に反応しやすいと考えられる。我々は刺激を与える前にゼブラフィッシュを 10 分間放置していたが、そのような刺激のない時間の直後の、最初の刺激に反応して区画を移動することが多かったのだ。ただし、給餌に対してはこれに関係なく反応していた。

##### [10 月]

この時点から刺激への反応は鈍くなっていたと言える。扉の刺激に反応して区画を移動した結果は無く、また他の刺激に反応したのも 10/27 に餌に反応して 1 個体が移動したものと、10/24 に蓋を取り外した後水面に寄りついたもののみであった。左の区画にいた個体は餌を食べたので、餌への興味は失われていなかったと考えられるが、これが原因で、ゼブラフィ

ツッシュが餌を予感するきっかけを10月の実験結果から探すのは難しかった。

[11月]

ほぼ常に左の区画に全個体が留まっていたため、ゼブラフィッシュが餌を予感するきっかけは調べられなかった。

左の区画に留まるようになった行動については、餌を得るのに適した区間に留まるのがよいということを学習したと思われるが、野生のゼブラフィッシュは主に水田やため池など流れのない場所に生息しているため、単にポンプによる水流がある右側を避けただけだという可能性もある。事実、左にポンプを移動させるとゼブラフィッシュは右に移動するという行動を確認している。もしそうであったならば、ゼブラフィッシュは餌よりも水流を重視するということになる。ただし11月になるまで全個体が左に留まるという行動は見られなかったため、餌の影響は当然あるだろう。

もう一点考えておきたいのは、ゼブラフィッシュが本来群れることを好む生物であるという点である。9、10月には、実験に用いたゼブラフィッシュの中に、寄ってきたほかの個体を追い払う個体を確認したが、11月、12月は確認できなかった。ゼブラフィッシュが群れることを好むということを考慮すると、左の方が餌を得やすい、あるいは左の方が水流がなくて快適だ、と全個体が感じていなくとも上記のような現象は起こる。

[12月]

12月になると餌を食べなくなった。このことについては未だ理由が不明である。水温や水質に差がない別の水槽で飼育していた個体は活発に泳ぎ回り餌をよく食べたことから水温や水質の影響ではないと考えられる。体格から判断して、ゼブラフィッシュの健康状態にも問題はないようにみえた。

## 5. まとめと今後の課題

ゼブラフィッシュは、なかなか我々の思うように動いてくれなかった。一番感じたことは実験の難しさであるが、それはゼブラフィッシュの予想を裏切る学習の仕方によるものである。左の区画に餌をやることを学習させるとずっと左の区画に留まるようになるというのは、我々の予想を超えた極端な学習の仕方であった。我々はゼブラフィッシュが何に反応し何を学ぶのかに焦点を当ててきたが、今ほどのようにそれを学んでいるのかに興味がある。今後は何を学習するのかだけでなく学習の方法を調べることなしには、ゼブラフィッシュのさらなる理解は望まれないだろう。

# シロアリ誘引剤を作る

## ～ ドクダミを用いた環境に優しい防除 ～

田邊裕紀 椎村響 山地夏鈴

### 要旨

本研究は環境に優しい対シロアリ防除の薬剤の作成を目的とする。我々はクロマトグラフィーと NMR (Nuclear Magnetic Resonance: 核磁気共鳴) を用いて、ドクダミのエタノール抽出物とヘキサン抽出物をそれぞれ単離しシロアリが反応する物質の特定を試みた。その結果、6つの成分に単離することに成功し、その中の2つの成分が1-ノナノールと2-ウンデカノンと推測した。また、これに従えば2-ウンデカノンは単独では道しるべ活性を示さず、2-ウンデカノンの道しるべ活性を促進する働きを持つと考えられる。

### 1. はじめに

シロアリは木材や木質材料に被害をもたらす害虫であることはよく知られている。2013年のシロアリ被害実態調査によると、昭和30年、40年代に比べて被害は縮小されているものの、依然としてごくまれに発生するというような被害率ではない。

しかし、現在シロアリ駆除のために用いられているシロアリ駆除剤は、頭痛や吐き気、ホームシック症候群など様々な健康被害をもたらしており(国民生活センター, 2002)、健康評価のためにかねてから薬剤に対する見つけ直しが求められている

(斉藤, 2015)。そもそもシロアリは森における分解者の役割を担っており、一概にシロアリを殺すことが環境によいこととも明言できないのである。

そこで本研究では、健康被害を巻き起こすことのない対シロアリの薬剤を作るために、シロアリ誘引効果ないし防除効果のある物質を探し出し、それらにたいしての効果実証実験を繰り返した。

シロアリが油性の黒ボールペンで引いた線上をたどって進むことはよく知られている現象である。このことに対して予備実験を行った(表1)。

	シロアリの反応	1回目の脱線時刻	効果継続時間
油性ボールペン(黒)	たどった	1分15秒	13分26秒
油性ボールペン(赤)	たどった	未検証	未検証
油性ボールペン(青)	たどった	未検証	未検証
水性ボールペン(黒)	反応なし		

表1

以上の結果から、シロアリは水性ボールペンでなく油性ボールペンの線上をたどり、また結果に含まれている染料には依存しないことが分かった。油性ボールペンと水性ボールペンの原料を比較すると、溶剤が異なった成分で構成されていることも分かった。前者の溶剤はケトン、アルコール、酢酸エチルなどの有機溶剤であるのに対して、後者の溶剤は水が多く含まれており、浸透剤としてアルコール、グリコールエーテルが含まれている。

## 2. 材料・研究方法

本研究では、油性ボールペン、ドクダミを用いてヤマトシロアリ(*Reticulitermes speratus*)の行動観察を行った。ヤマトシロアリは宝ヶ池周辺の山で捕獲し、ドクダミは校内で採取した。実験はヤマトシロアリの働きアリ、兵隊アリを対象とした。

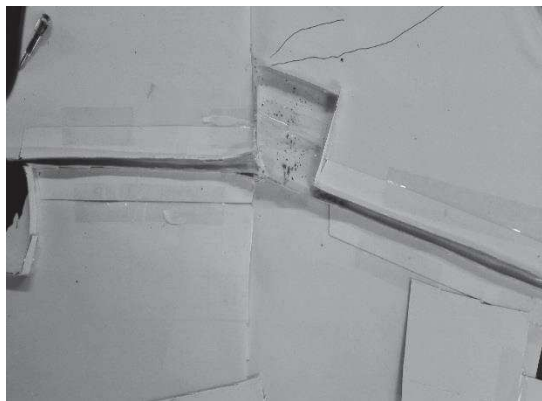


写真1

### 検証1. 油性インクの誘引性検証

予備実験において油性ボールペンのインクには道しるべ活性が見られた。それを受けて、油性ボールペンのインクには誘引性があるかどうかを検証するための装置を作った(写真1)。片方の通路の先には何も置かず、もう片方の通路の先には油性ボールペンのインクだめを用意した。シロアリを20個体中心の空間に放ち、覆いをして暗闇にした。そして、13分後のシロアリの様子を観察した。

その後、我々はシロアリがドクダミの抽出液で引いた線上をたどるといった情報をインターネット上で

見つけ、このことについて効果実証実験を行った。

### 検証2. ドクダミの道しるべ活性検証

純水、エタノール、ヘキサン、ドクダミの葉、マイクロピペット、乳棒、乳鉢を用いた。

乳棒と乳鉢を使って、純水、エタノール、ヘキサンを溶媒としてドクダミの葉を抽出した。これは油性ボールペンの溶剤に有機溶媒が含まれていたためである。対照実験として純水でも抽出した。マイクロピペットを用いてドクダミ抽出物で細い線を描いた。その線のそばにシロアリを1個体ずつ放し、様子を観察した。

### 検証3. 誘引物質の分離・同定

抽出物、ブラックライト、ヨード、ヘキサン、酢酸エチル、薄層クロマトグラフィー(順相シリカゲル担体)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、<sup>1</sup>H-NMRを用いた。

3種類の抽出物を薄層クロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)にかけた。その展開層にブラックライトを照射した。この展開層を三角フラスコ内でヨードを使って用意したヨウ素蒸気に当てた。確認できたスポットに印をつけた。

次に確認できたスポットの部分を単離するために抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけた。単離した後、NMRをとってそれぞれの物質の同定を試みた。

## 3. 結果

### 結果1

検証1では油性ボールペンに誘引性があるのかを知るため、方法の通り継続時間の13分間観察した結果、20個体のシロアリはスタート付近から動かないか、写真1の通路のところでとどまるかの2つの行動のみ見られた。

### 結果2

検証2において、純水抽出液で引いた線には

どのシロアリも横断するなどして、影響を受ける様子は見せなかった。

エタノール抽出液で引いた線では道しるべ活性が見られ、約 2 分たどることがわかった。

ヘキサン抽出の際、添付資料写真 2 のように抽出物は溶液とゾル状の沈殿とに分かれた。これを受けて溶液とゲル状沈殿それぞれで効果を検証した。その結果、溶液は道しるべ活性を示さず、ゾル状沈殿は 30 秒～1 分間道しるべ活性が見られた。だが、我々の所見ではエタノール抽出液よりはたどる時間が短く効果が弱いように見られた。

### 結果 3

検証 2 で得られた結果より、薄層クロマトグラフィーにはエタノール抽出液、ヘキサン抽出物の溶液、ゾル状沈殿の 3 種類をかけた。結果を比較しやすくするため、1 つの版に 2 つのスポットを打って実験を行った。

本実験で用いた担体には UV インジケーターが配合されているため、UV を照射すると灰かに蛍光を発する。芳香環など UV を吸収するサンプルは UV インジケーターの蛍光を阻害するので、薄層クロマトグラフィーに UV を照射してスポット位置を確認した。さらにはヨウ素の吸着性を利用して有機化合物のスポット位置を見やすくした。

まず抽出物に薄層クロマトグラフィーにかけて、UV を照射した様子を示す。(添付資料写真 3, 4)。添付資料写真 5, 6 の丸で囲った位置にスポットが確認された。続いてヨウ素にさらした後の様子を示す(添付資料写真 7, 8)。

これらの写真から分かるようにエタノール抽出液で最も多くのスポットがみられた。ヘキサンの溶液、ゾル状沈殿のスポットはともにエタノール抽出液にも見られるスポットである。また、ヘキサン抽出物の溶液とゾル状沈殿のスポットを比較すると、溶液は高い位置、ゾル状沈殿は低い位置にスポットが見られた。

エタノールのスポットには他の 2 つの溶媒で見られたスポットもすべて含まれていたため、シリカ

ゲルカラムクロマトグラフィーによる単離はエタノールのみ行った。

写真 8 と 9 でエタノール抽出液のスポット数にばらつきがあったため、薄層クロマトグラフィーを再び行った結果、6 つのスポットが確認された。そして 6 つの物質を単離できた(添付資料写真 9)

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られた 6 つの物質を  $^1\text{H-NMR}$  で測定したスペクトルを添付資料 10 に示す。

### 4. 考察

結果 1 を受けて、シロアリはインクだめに反応しなかったことから、油性ボールペンには強い誘引性はないと考えられる。

結果 2 より、純水抽出液にはシロアリは反応しなかったことから、純水には反応物質は溶け出していなかったと考えられる。エタノール抽出液にはシロアリは反応したことから、エタノールには反応物質は溶け出していたと考えられる。ヘキサン抽出溶液部分にシロアリは反応しなかったことから、反応物質は溶液部分には溶け出しておらず、ゾル状沈殿には反応したことから、ゾル状沈殿部分には反応物質は含まれたと考えられる。ここで、溶質は似た極性の溶媒によく溶けることから、反応物質は水ほど大きな極性は持っておらず、ヘキサンと同様の無極性でもないと考えられる。エタノールに溶けたことからエタノールと似た極性と考えられる。

また、エタノール抽出液と比べてゾル状沈殿に対するシロアリの反応時間が短かった。このことから、シロアリが反応する物質は極性の大小に差がある複数の物質であると推測する。すなわち反応物質以外に道しるべ活性を促進する作用を持つ物質があり、それらが合わさってより強い反応性を持つと推測する。

結果 3 の UV 照射やヨウ素吸着の結果を受けて、考察をまとめたものを表 2 に示す。

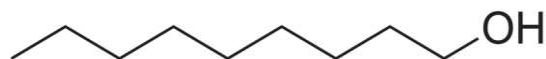
成分	極性	環状構造	二重結合
1	低	×	○
2	↑	×	×
3		×	○
4		×	○
5		×	×
6	高	○	○

(表2)

また、ヘキサン抽出液の溶液部分にシロアリは道しるべ活性を示さなかったことと、添付資料7にみられることから、エタノール抽出液とヘキサン抽出溶液部分に共通してみられた極性が低い位置にできたスポットは反応物質ではないと考えられる。ただ、道しるべ活性を促進する作用を示す物質である可能性は残る。

次にヘキサン抽出液のゲル状部分にシロアリは道しるべ活性を示したことから、添付資料8にみられることから、エタノール抽出液とヘキサン抽出ゲル状部分に共通してみられた極性が高い位置にある2つのスポットのうちどちらか、もしくは両方が反応物質だと考えられる。ただ先ほどと同様、促進作用を持つ物質が含まれている可能性はある。

我々は本研究の途中で我々と似た実験を行い、2つの反応物質を同定したという既存の論文をみつけた(大村, 2003)。2つの物質を下に示す。



1-nonanol



2-undekanone

ただ、ここに至るまでの過程は我々独自のものであり、また結論を確認するという意味でもその後も我々は最後まで研究を継続した。

NMRの解析を試みたが我々の知識では物質の特定には至らなかったため、成分1~6の間に上に示した2つの物質があるかどうかを確認するという形をとった。その結果、成分5が1-ノナノールであった。

2-ウンデカノンについては成分1が最も近かったが、2-ウンデカノンには含まれないアルケンがN

MRにみられたため、確証は得られなかった。

## 5. まとめと今後の課題

油性ボールペンにはシロアリに対する道しるべ活性はあるものの誘引効果は見られないことが分かった。さらにシロアリはドクダミのエタノール抽出液に道しるべ活性を示し、またヘキサン抽出の際には溶けきれなかったゾル状沈殿が生じ、それらも道しるべ活性を示すことも分かった。クロマトグラフィーを用いてそれぞれを単離し、NMRの結果と既存の論文にある反応物質を比較したところ、成分5がヘキサン抽出溶液部分に溶けた1-ノナノールだと考えられた。2-ウンデカノンについてはヘキサン抽出液ゲル状部分に溶けた成分1だと推定された。既存の論文では両成分の働きの違いや交互作用については分かっていなかった。もし成分1が2-ウンデカノンだとすれば、2-ウンデカノンは単独では誘引効果を示さず、1-ノナノールの誘引効果を促進する働きがあると考えられる。本研究を応用すれば、ドクダミの誘引効果のメカニズムを明らかにすることによって、強力な誘引剤の製作につながるかもしれない。

## 6. 謝辞

夏休みの研究室訪問を通してお世話になり、その後も機材や場所を貸していただいた京都府立大学の細矢研究所のみなさまをはじめ、本研究に携わってくださったみなさまに多大なる感謝をこめてこの場を借りて御礼申し上げます。

## 7. 参考文献

- 国民生活センター 2002  
 斎藤育江・大貫文・鈴木俊也, 2015, シロアリ駆除由来のネオニコチノイド系殺虫剤による環境汚染  
 国土交通省, 2013, シロアリの実態報告書  
 大村 和香子, 2003, ドクダミ抽出物のシロアリ道しるべ活性

## 8. 添付資料



写真2(ヘキサン抽出液)  
ビーカー下部(ゾル状沈殿)

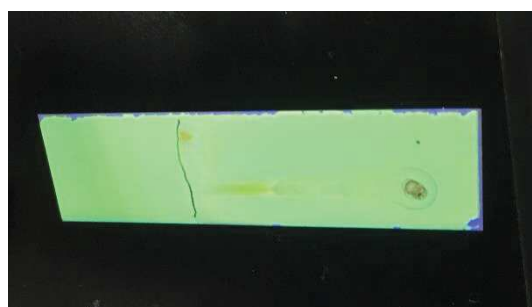


写真3(UV 照射したエタノール抽出液とヘキサン抽出溶液部分)



写真4(UV 照射したエタノール抽出液とヘキサン抽出ゾル状沈殿部分)

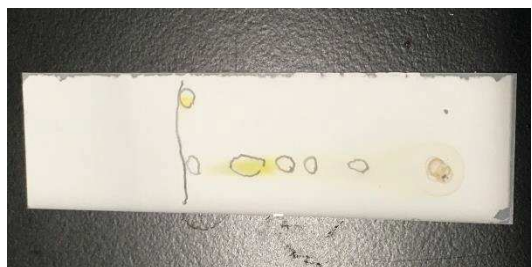


写真5(エタノール抽出液とヘキサン抽出溶液部分の UV で確認できたスポット)

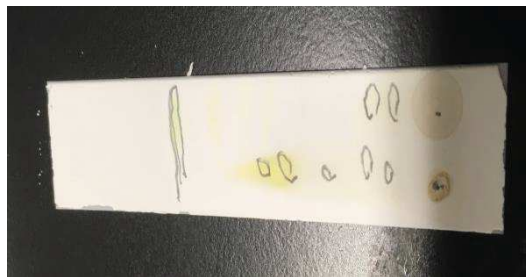


写真6(エタノール抽出液とヘキサン抽出ゾル状沈殿部分の UV で確認できたスポット)



写真7(ヨウ素蒸気中のエタノール抽出液とヘキサン抽出溶液部分)



写真8(ヨウ素蒸気中のエタノール抽出液とヘキサン抽出ゾル状沈殿部分)



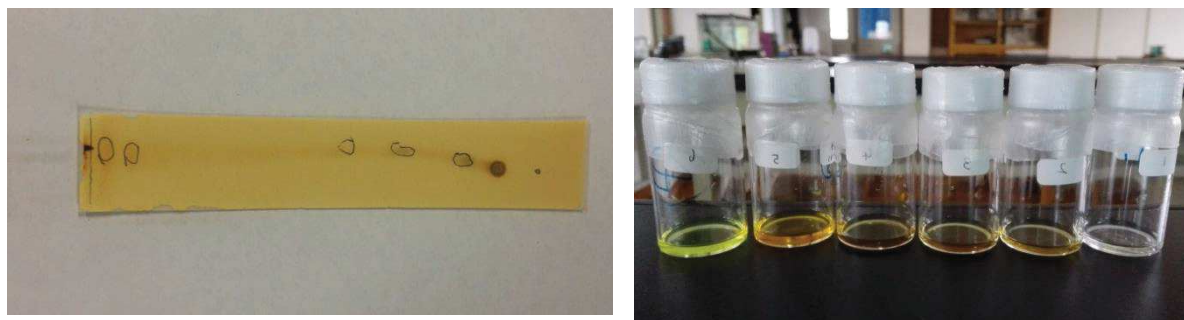


写真9(単離した6つの物質を示す薄層クロマトグラフィーの結果とそれらを含む溶液)

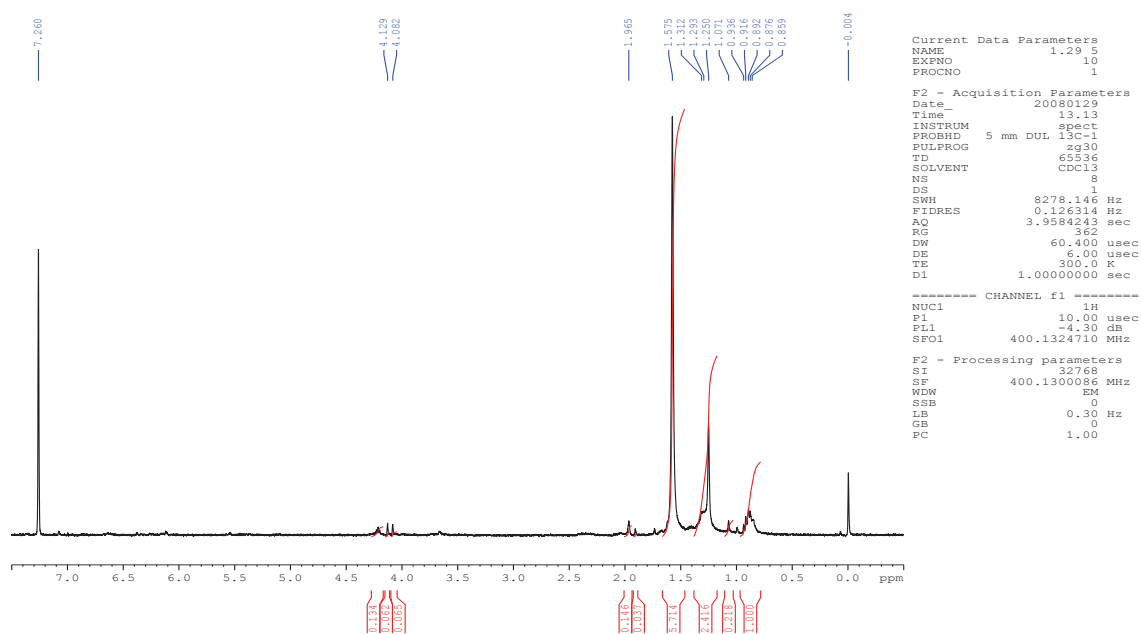


写真10(成分5のNMR結果)

# なぜ院内感染がおこるのか？

## ～ 大腸菌培養による薬剤耐性の解明 ～

内田那々子 中川隆乃介 中野勇輝

### 要旨

本研究では、アンピシリン感受性大腸菌にアンピシリンを投与し、24時間以上生存した大腸菌のコロニーを採取し、再培養した。その結果、再培養した大腸菌は当初よりもアンピシリンに対して高い耐性を示し、よって薬剤耐性菌を実験操作によって選択できたとと言える。このことから薬剤耐性菌を原因とする院内感染の人為性が確認された。

### 1. はじめに

医療技術の進歩によって、私達の国日本では現在、感染症等の治療に抗生物質が広く使用されている。しかし、抗生物質の登場によって新たに様々な問題が浮上してきた。そのうちの 하나가院内感染である。はじめに、感染症治療の為に抗生物質を使用することにより、それに対する薬剤耐性菌の出現が助長される。次に、抗生物質が効きにくい為に、その耐性菌により、感染症が院内で蔓延する。これが院内感染の主な発生のプロセスである事が既に知られている(日本感染症学会, 2010)。また、ここから分かるように、薬剤耐性菌の出現は全くもって「偶然的」とは言い切れず、「人為的」側面も持ち合わせている。そこで私達は、院内感染を防ぐ、または遅らせる余地があるかもしれないと思い、知られているこのプロセスを実験室で再現することでそれを見つけ出そうと考えた。

再現をするにあたって、耐性菌が発生してから院内で蔓延するまでを再現することは困難である。よって、本研究では抗生物質の投与から薬剤耐性菌が出現するまでを再現することを目指して、実験の目的を「抗生物質の投与によって、薬剤耐性菌を人為的に出現させる」とした。

薬剤耐性菌は、致死濃度に近い値で抗生物質を投与することによって選択しやすくなると考え、

その濃度を調べるために予備実験を行った。実験結果より、致死濃度は約  $1.0 \times 10^{-1}$  g/L と分かった。次に、「薬剤感受性を持つはずの菌であっても個体差があり、薬剤の投与によって耐性を持つ菌のみが増える」という仮説を立て、本実験を行った。

### 2. 材料・研究方法

#### 2-1. 研究試料

本実験で用いた大腸菌はJM109株で、これはアンピシリン感受性を持つ。液体培地は2.5%LBブイヨン、固体培地は2%の寒天を含むLBブイヨンで培養した。

#### 2-2. 研究方法

##### 【実験1】

液体 LB 培地 20 mL に  $1.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $2.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $3.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $4.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $5.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $6.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $7.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $8.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $9.0 \times 10^{-2}$  g/L,  $1.0 \times 10^{-1}$  g/L,  $1.0 \times 10^0$  g/L のアンピシリンナトリウム水溶液(以下アンピシリン)をそれぞれ 200  $\mu$ L ずつ、大腸菌培養液(以下大腸菌)を 20  $\mu$ L ずつ加え、37°Cの環境下で 24 時間培養した。その後それぞれの試験管から 20  $\mu$ L を固体培地に移しコンラージ棒で広げ、同様に 37°C で 24 時間培養した。

### 【実験2】

【実験1】で得られた  $1 \times 10^0$  g/L のシャーレのコロニーから大腸菌を取り出して培養し、これを大腸菌 X と名付けた。液体 LB 培地 20 mL に  $2.5 \times 10^0$  g/L,  $5.0 \times 10^0$  g/L のアンピシリンを 20  $\mu$ L 加えたものを2本ずつ用意し、それぞれに大腸菌 X を 20  $\mu$ L ずつ加え、37°C で 24 時間培養した。その後それぞれの試験管から 20  $\mu$ L を固体培地に移しコンラージ棒で広げ、同様に 37°C で 24 時間培養した。

### 【実験3】

それぞれ液体 LB培地 20 mL に  $1.0 \times 10^{-1}$  g/L ,  $1.0 \times 10^0$  g/L ,  $2.5 \times 10^0$  g/L,  $5.0 \times 10^0$  g/L のアンピシリンをそれぞれ 200  $\mu$ L ずつ加えたものを 2 セット作成し、それぞれに【実験2】の  $5.0 \times 10^0$  g/L のコロニーから得られた大腸菌 X 及び【実験1】で使用した大腸菌を 20  $\mu$ L ずつ加え、37°C の環境下で 24 時間培養した。その後それぞれの試験管から 20  $\mu$ L を固体培地に移しコンラージ棒で広げ、さらに 37°C で 24 時間培養した。

## 3. 結果

### 【実験1】

アンピシリン濃度が高まるにつれコロニー数は減少した。しかし、⑩  $1 \times 10^0$  g/L のシャーレのうち一つが大きい値を示した(表1)。

### 【実験2】

【実験1】で扱ったものより大幅に高い濃度のアンピシリンであったが、少数の大腸菌が残った(表2)。

### 【実験3】

アンピシリン耐性のない大腸菌に比べて、大腸菌 X はアンピシリンに対して強い耐性を示した。それと同時に大腸菌 X もある一定量のアンピシリンを投与すれば増殖しなかった(表3, グラフ1)。

	濃度 [g/L]	コロニー 数[個]		濃度 [g/L]	コロニー 数[個]
①	$1 \times 10^{-2}$	計測不能 (*)	⑦	$7 \times 10^{-2}$	60
②	$2 \times 10^{-2}$	*	⑧	$8 \times 10^{-2}$	141
③	$3 \times 10^{-2}$	*	⑨	$9 \times 10^{-2}$	39
④	$4 \times 10^{-2}$	*	⑩	$1 \times 10^{-1}$	-
⑤	$5 \times 10^{-2}$	*	⑪	$1 \times 10^0$	1, 58, -
⑥	$6 \times 10^{-2}$	123			

(表1)

	濃度 [g/L]	コロニー 数[個]		濃度 [g/L]	コロニー 数[個]
①	$2.5 \times 10^0$	0	③	$5.0 \times 10^0$	0
②	$2.5 \times 10^0$	1	④	$5.0 \times 10^0$	2

(表2)

耐性なし(各2)			大腸菌 X(各2)		
	濃度 [g/L]	コロニー 数[個]		濃度 [g/L]	コロニー 数[個]
①	$1.0 \times 10^{-1}$	-, -	⑤	$1.0 \times 10^{-1}$	10, 40
②	$1.0 \times 10^0$	0, -	⑥	$1.0 \times 10^0$	14, 22
③	$2.5 \times 10^0$	0, 0	⑦	$2.5 \times 10^0$	3, 2
④	$5.0 \times 10^0$	0, 0	⑧	$5.0 \times 10^0$	0, 0

(表3)

## 4. 考察

### 【実験1】

他の個体が増えなかったにも関わらず⑩のシャーレの大腸菌のみ異様に増えたことから、このシャーレに薬剤耐性菌が含まれているのではないかと考えた。

### 【実験2】

【実験1】で扱ったものより大幅に高い濃度のアンピシリンであったが、少数の大腸菌が残ったことから、今回使用した大腸菌の中にアンピシリンに耐性を持つ個体が含まれていたことがより確からしくなった。

### 【実験3】

対照実験によって【実験2】で培養した菌が【実験1】で扱ったものより高い耐性を持っていることが分かった。

以上の実験では、薬剤耐性菌の人為的な選択に成功した。この耐性菌の選択という現象が院内感染の根底にあると考察する理由を以下に述べる。

まず薬剤耐性を持つ菌が出現する原因として第一に考えられるのは突然変異である。実験開始当初の我々の仮説においても、アンピシリンにさらされた大腸菌は突然変異をおこすものと予測していた。しかしながら突然変異とは偶発的に発生するものであって、本来全くアンピシリンに対し耐性を持たなかった菌が 24 時間という短期間でアンピシリンに対し限定的に耐性を獲得するという事は非常に稀であり、今回の実験でこれが起こったということは考えにくい。

今日までの研究より、DNA 上の突然変異の発生は、DNA の複製エラーや DNA 損傷が原因となっているとされているが、それらの DNA の異常は細胞が持つ多数の修復機構や細胞周期チェックポイント機構により巧妙にかつ高い効率で取り除かれ、普通の環境中で生育する細胞の突然変異(自然突然変異)は非常に低い頻度でしか生じないということが分かっている。今回の実験においても紫外線の照射などといった DNA 損傷及び突然変異を誘発するような実験は行っていない。つまり【実験1】で得られた高耐性の菌は実験中に突然変異を起こした菌ではないという結論が得られる。

そこで考えられることが、同じ株の大腸菌の中でも様々な個体差があるのではないかということだ。同じ株の中にも一定の致死濃度というものも存在せず、個体差があるならば同じアンピシリン環境下において死亡する菌と生き残る菌とが存在すると考えられる(図1)。同じ大腸菌に同じ抗生物質を投与しても生き残る菌と死滅する菌との 2 型が

生じるのである。

アンピシリンの投与によって一部のアンピシリン耐性が高い菌が生存した場合、つまりアンピシリン耐性の低い菌が死滅しアンピシリン耐性の高い菌のみが生き残っていくような環境においては、それらの生き残った耐性の高い大腸菌群が増殖することで、全体としてアンピシリンを投与する前の耐性の水準よりもさらに高い耐性の水準を持つようになるということが考えられるのである。

このように耐性の高い個体のみを選び出していく行為、つまり抗生物質の連続的な投与は薬剤耐性菌の自然選択に等しいという事が分かる。

### 5. まとめと今後の課題

以上の実験から大腸菌にアンピシリンを投与することで、逆にアンピシリン耐性の高い大腸菌を増殖させることが起こり得るという考察が得られた。これと同じ現象が院内感染の現場においても起こっていると考えられる。

殺菌しようと試みて抗生物質を投与しても、その中で生き残った菌が増殖した場合それらを殺菌することはより困難となる。このことを防ぐには、比較的耐性の高い個体でも生存が難しくなるような高濃度での抗生物質の投与を行わねばならないといえるだろう。

しかしながら抗生物質の過剰な投与は患者に負担を与えるのみならず、もしその高濃度にも耐え得る菌が出現した場合、同じようにそれら高耐性菌を選択し増殖させてしまうという事も考えられる。

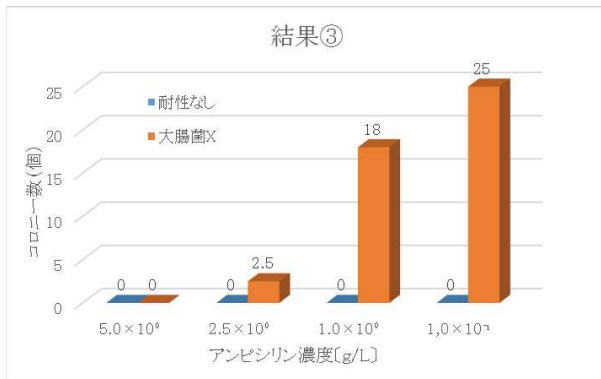
そこで我々からの医療現場に対する提案としては、抗生物質を患者に用いるときには菌が生き残りやすいような低濃度での投与を避け、また抗生物質の過剰な投与を防ぐために、時には抗生物質を用いない療法を採るべきであるということだ。

### 6. 参考文献

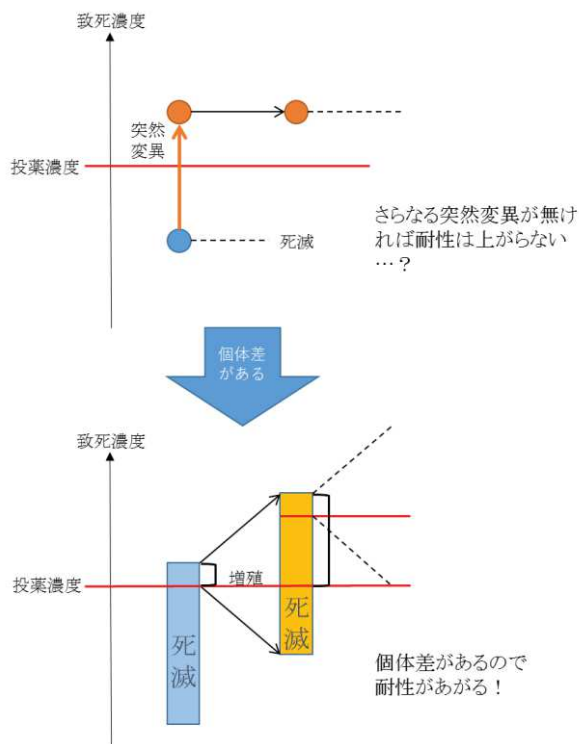
日本感染症学会, 2010, 多剤耐性菌情報,  
[www.kansensho.or.jp](http://www.kansensho.or.jp)

奈良先端科学技術大学院大学, 2018, 自然突然  
 変異,  
<http://bsw3.naist.jp/maki/?page=204>

## 7. 添付資料



(グラフ1)



(図1)

# 植物性乳酸菌で腸内環境を変える

## ～京漬け物の魔法～

秋間友莉子 浅田美紅

### 要旨

腸内環境を整えるのに効果的なお漬け物はどれかを調べるために、お漬け物の乳酸菌を培養してコロニーの観察やその培地の pH の変化を調べた。実験から、しば漬けが最も多く乳酸菌を含みすぎきが少ない、はりはり漬けなどの浅漬けはあまり多くの乳酸菌を含まずその繁殖力も弱い、周りを酸性にする力はすぎきの乳酸菌が1番強い、ということが明らかになった。

### 1. はじめに

私達は、京都の名物「京漬け物」に着目し、どのお漬け物の乳酸菌がおなかの調子を整えるのに最も有効かについて調べた。乳酸菌はグラム陽性の桿菌もしくは球菌であり、消費したブドウ糖から 50%以上の乳酸を生成する細菌、と定義される。また、乳酸菌は活動する時に乳酸を生成するため周りの環境を酸性にする力がある。

腸内の環境を良くするには腸内の善玉菌を増やす必要があり、そのためには腸内を善玉菌が住みやすい弱酸性に近づけることが重要になる。しかし、私達の分泌する腸液はアルカリ性で腸内はどうしても弱アルカリ性に傾きやすい。一方で、乳酸菌を取り込むことで乳酸菌の力によって腸内の状態を良くすることができるがわかっている。そこで、私達はより周りの環境を酸性にする力が強い乳酸菌がより腸に効果的だと考え、どのお漬け物の乳酸菌が周りの環境を酸性にできるかについて調べた。また、それぞれのお漬物の乳酸菌がどんな特徴を持つかも調べた。

### 2. 材料・研究方法 手順, 条件

#### 2-1 研究試料

漬け物屋で買ったすぎき、しば漬け、はりはり漬け(千枚漬けの季節が終わってしまったので1回目の実験だけ千枚漬けで行った)の漬け汁、漬け

汁の希釈液として 0.85%NaCl 水溶液を用いた。培地は MRS 培地 (Merck) で固体培地には 1.6%寒天を加えた。(参考文献 1.参照)さらに寒天培地には CaCO<sub>3</sub>を加えた。

培地に入れる炭酸カルシウムは乳酸菌コロニーの指示薬として加えるのであり、栄養物として加えるのではない。

#### 2-2 研究方法

純水 400mL を培地びんに入れ、MRS 培地 22g、炭酸カルシウム 4g、寒天 6.4gを加えてスターラーで溶解し、寒天培地を作った。0.85%の食塩水を 100g作り、培地とともにオートクレーブで 121°C 15 分滅菌した。滅菌後の培地は、スターラーでかき混ぜながら 45°C に保温した。

また、後半の実験では最初から寒天培地ではなく液体培地で漬け物の汁に含まれる乳酸菌を培養し始めた。この液体培地は純水 400mL に MRS 培地 22g を加えてオートクレーブして作った。

クリーンベンチ内で滅菌食塩水 4.5mL に漬け汁 0.5 mL をサンプルチューブに入れ、10 倍に希釈した溶液を 1 種類ずつ計 3 本作った。この溶液を 0.1 mL とり 0.9 mL の食塩水に加え、同様に 10<sup>6</sup>倍まで希釈列を作成した。滅菌シャーレに希釈倍数を書き、各希釈溶液から 100μL 入れた。

保温しておいた寒天培地を 20mL 注ぎ, よく混合して静止する. 寒天が固まったら上下反転してふたについた結露を乾かす. 乳酸菌は嫌気性細菌であるため, シャーレをエージレスと一緒にジップロックに入れて 30°C のインキュベータで 4 日間培養した.

液体培地ではコニカルチューブに空気があまり入らないようにぎりぎりまで培地を注いで, 各希釈溶液から 100 $\mu$ L を入れ, エージレスとともにジップロックにいれて 30°C で 4 日間培養した.

コロニーを観察後, コロニーを少しとって顕微鏡で観察し乳酸菌がいるのかどうか確かめた. 純水 400mL, MRS 培地 22g で液体培地を作って滅菌し, コロニーをそれぞれの培地に入れ, 30°C で 3 日間培養した.

液体培地を上と同様にして作り, 塩酸と水酸化ナトリウムを加えて, オートクレーブ後にだいたい pH5,6,7,8 になるように液体培地を作った. (オートクレーブをすると培地の pH は 7 に近づく傾向がある) それぞれの培地から 10 $\mu$ L の菌液をそれぞれの pH の培地に植菌し, 3-4 日間培養した後, 溶液の pH を調べた.

### 3. 結果

寒天培地でお漬け物の原液から乳酸菌を育てたときのコロニーの数と漬け物の液の希釈濃度の関係は次のような結果になった. 乳酸菌のコロニーの周りが透明なのは CaCO<sub>3</sub> の溶解=酸性化による.

1 回目

	すぐき	しば漬け	千枚漬け
$\times 10$	×	$\infty$	×
$\times 10^2$	×	×	$\infty$
$\times 10^3$	×	×	140
$\times 10^4$	×	×	5
$\times 10^5$	×	×	×
$\times 10^6$	×	×	×



すぐき $\times 10^6$   
凸レンズ合体形の大きなコロニーが見られた.



しば漬け $\times 10$   
両凸レンズ形と凸レンズ合体形の小さいコロニーが多かった.



千枚漬け $\times 10^3$   
凸レンズ合体形の中くらいの大きさのコロニーが見られた.



千枚漬け×10<sup>4</sup>

完全にはできていないがそれらしきクリアゾーンが見られた。

## 2回目

	すぐき	しば漬け	はりはり漬け
×10	6	40	16
×10 <sup>2</sup>	20	70	6
×10 <sup>3</sup>	5	45	1
×10 <sup>4</sup>	2	10	8
×10 <sup>5</sup>	16	7	9
×10 <sup>6</sup>	2	11	1

コロニーはしば漬けは小さくて数が多く、すぐきは大きくて数が少なかった。はりはり漬けはあまりできておらず、大きさもほかのものより小さかった。

3回目 はりはり漬けの×10で1つコロニーが見られた。

## 4回目

	すぐき	しば漬け	はりはり漬け
×10	4	2	×
×10 <sup>2</sup>	×	1	×
×10 <sup>3</sup>	×	×	×
×10 <sup>4</sup>	×	×	×
×10 <sup>5</sup>	×	×	×
×10 <sup>6</sup>	×	×	×

液体培地で行ったときの元の培地(オートクレー

ブにより pH は変化するため pH は 5,6,7,8 に近い値になるようにした)と乳酸菌培養後の pH の変化は次のようになった。

※乳酸菌培養後の pH の値は同じものを 2 本ずつ培養した結果の平均値である。

1回目 すぐきは 2 種類, しばは 1 種類

すぐき ほぼ 5 → 3.67	しば ほぼ 5 → 3.68
5.88 → 3.79	5.88 → 3.88
6.37 → 3.85	6.37 → 3.96
6.96 → 3.95	6.96 → 4.06

すぐきはもう 1 種類培養したが、顕微鏡で観察したところカビだったので pH の変化は測定しなかった。

2回目 すぐき, しばともに 1 種類

すぐき 4.89 → 4.93	しば 4.89 → 4.92
5.93 → 5.97	5.93 → 5.71
6.79 → 6.77	6.79 → 6.22
7.63 → 7.57	7.63 → 7.46

## 4. 考察

5回の実験のうち、4回は寒天培地でお漬物の原液からの最初の培養を行った。それらの培地では、しば漬けのコロニーの数が1番多く、その次にはりはり漬け、すぐきのコロニーの順であった。また1つのコロニーに含まれる菌数はほぼ同じであることから、元々のお漬物に入っている乳酸菌の量はしば漬けが1番多く、すぐきが1番少ないと思われる。それぞれのコロニーの大きさを比べると、しば漬けとはりはり漬けは小さくすぐきが大きかった。コロニーの大きさはその菌の種類によって変わるため、それぞれのお漬物に含まれる乳酸菌の種類は異なると考えられる。また全ての培養で比較的しば漬けが育ちやすかったことから、しば漬けの乳酸菌が一番繁殖力が強いと思われる。逆にはりはり漬けの乳酸菌はあまり安定して繁殖せず、コロニーが観察できない時もあり、原液を観察したときもしば漬けやすすぐきほど多くの乳酸菌をみ



ることはできなかった。はりはり漬けは一晩漬けただけでも完成するような浅漬けであるため、やはりそのような浅漬けにはあまり乳酸菌は含まれておらず含まれていても繁殖力が弱いことがわかった。また、桿菌と球菌はどのお漬け物にも含まれていた。含まれている数の割合はお漬け物ごとに違ったが、規則性は見られなかった。

また、私達は寒天培地と液体培地の両方で培養を行った。寒天培地よりも液体培地の方が乳酸菌が増えやすかったが、液体培地では見た目が乳酸菌とそっくりのカビが繁殖しやすくもあった。そのカビが生えている液体培地では、乳酸菌が繁殖している液体が少し白く濁っているのに対して液体が透明だった。

培地の pH を変えて行った実験では、まずほぼ全ての培地の pH が培養前よりも酸性になったことから乳酸菌が周りの環境を酸性にする力があることがわかる。また培養後のしば漬けとすぐきの培地の pH は、0.1ほどの pH の差(すぐきのほうがより酸性に近づいていた。)はあったもののほぼ同じ結果だった。それぞれのお漬け物に含まれる乳酸菌の数はしば漬けが多くすぐきが少なかったことを考えると、乳酸菌1つあたりの周囲を酸性にする力はすぐきが強いといえる。はりはり漬けは pH を変えて培養する前の培養で2回とも菌を増やすことができなかったのも、比較できなかった。

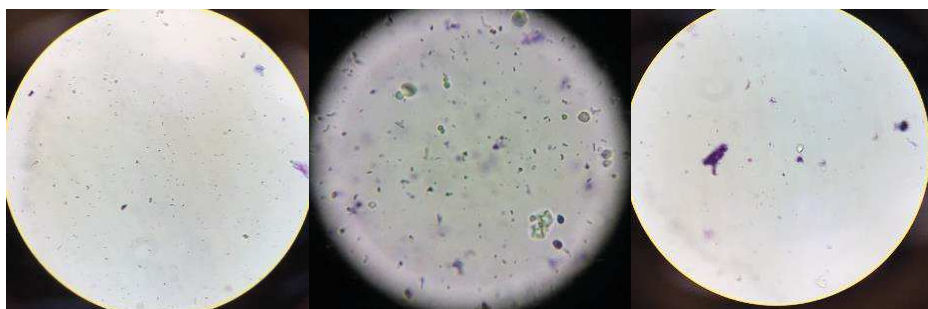
## 5. まとめと今後の課題

今回の結果より、しば漬けが最も多く乳酸菌を含みすぐきが少ない、はりはり漬けなどの浅漬けはあまり多くの乳酸菌を含まずその繁殖力も弱い、周囲を酸性にする力はすぐきの乳酸菌が1番強い、ということがわかった。このことからより腸に効果的なお漬け物はすぐきだと考えた。今後の課題としては、さらに何回も pH を変えた培地での培養をすることで結果の精度を高めたり、その乳酸菌を使ってほかの発酵食品を作れないかを試してみたい。

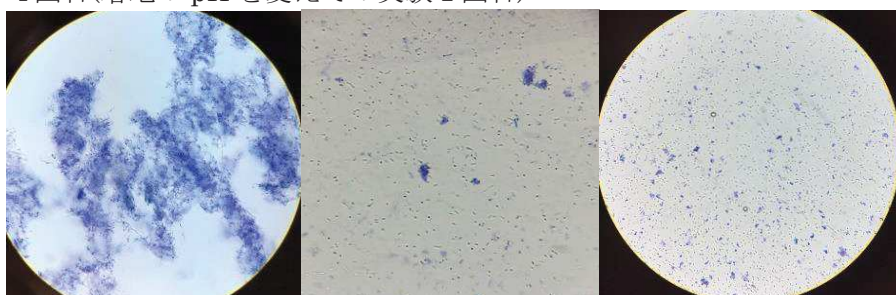
## 6. 参考文献

- 鈴木チセ (独) 農研機構 畜産草地研究所, 2008, 食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作, p41, 42
- 内村泰, 岡田早苗, 1992, 乳酸菌実験マニュアル; 分離から同定まで, 朝倉書店, p12~15, p 39~40
- 中山大樹, 多田 多摩川大学農学部, 1958, 細菌等の発育阻害現象について, p 133

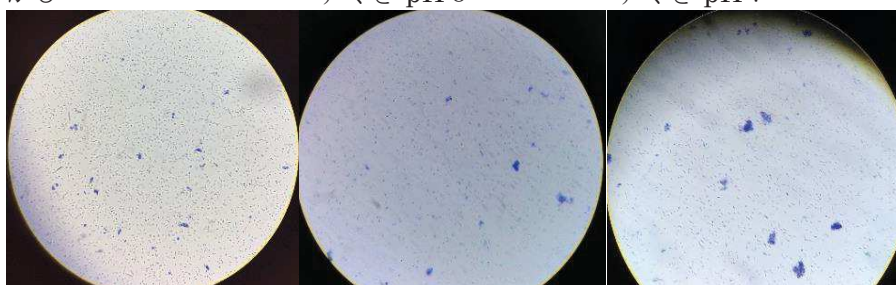
## 8. 添付資料



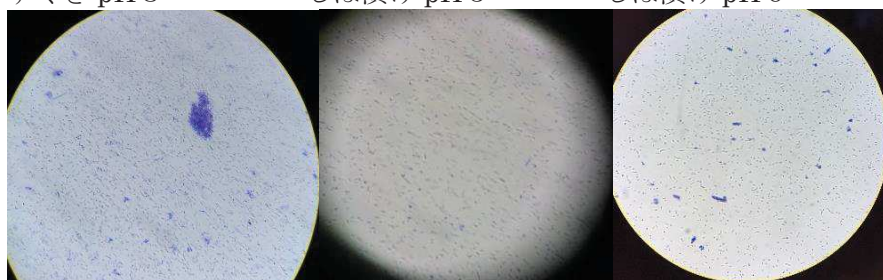
すぐき原液                      しば漬け原液                      はりはり漬け原液  
 すぐきとしば漬けは多くの乳酸菌が見られ、はりはり漬けではまばらである。  
 4回目(培地の pH を変えての実験 1 回目)



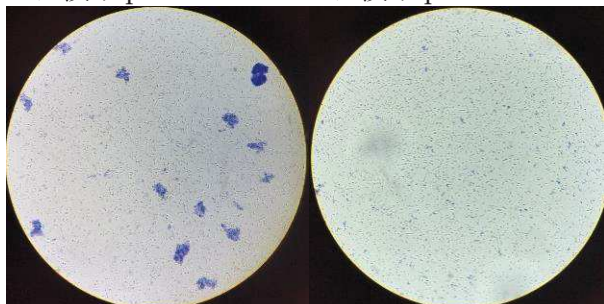
かび                      すぐき pH 6                      すぐき pH 7



すぐき pH 8                      しば漬け pH 5                      しば漬け pH 6



しば漬け pH 7                      しば漬け pH 8                      しば漬け pH 5



しば漬け pH 6                      しば漬け pH 7  
 しば漬け pH 8 とすぐき pH 8 の写真は取り忘れた。

# ゼブラフィッシュの左右記憶力

## ～T字路実験による検証～

古仲達貴 佐々木友希 清水陽華莉

### 要旨

一般に魚はあまり頭が良くないと思われているが、本当は記憶力がしっかりあるはずだと考えた。そこでまず、扱いやすく入手が容易なゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) で左右を覚えることができるのかをT字路を用いて二つの実験を行った。その結果、ゼブラフィッシュは左右を覚えることができるようであるともできないようであるともはっきりとはわからなかったが、記憶力は確かにあるようであった。

## 1. はじめに

### 1-1. 実験1

魚を飼ったことがある人ならわかるはずだが、魚は餌が来る場所を覚えることができるようである。また、めだかは左右の記憶ができるようだ(濱嶋渡, 2000)。そこで、ゼブラフィッシュも左右を覚えることが出来そうだと考え、まず、バット内に仕切り板でT字路を設置しT字路実験を行った。

### 1-2. 実験2

T字路実験において、ゼブラフィッシュが何かを覚えるらしいということが実験1でわかったが、左右を覚えたからということ以外に考えられる原因があまりにも多かった。そこで、少しでも左右を覚えたからということ以外に考えられる原因を無くすために、飼育水槽内でT字路実験を行えるようにした。また、覚えたか否かの評価方法も追加した。

## 2. 材料・研究方法

### 2-1. 研究試料

#### 2-1-1. 実験1の研究試料

バット内に仕切り板でT字路を作った(図1)。図のS<sub>1</sub>エリアの上の仕切り(スタートゲート)は下が0.8ミリあいていて通り抜ける。このバットは同時に2個体の試行を行え、図はその半分である。ゼブラフィッシュは、今まで実験に参加したことの

無い個体12個体を用いた。

飼育は(h24.5×28.5×19.5)の水槽内で12個体を飼育した。餌は市販の乾燥ミジンコを用いた。水は市販のカルキ抜き材でカルキを抜いたものを用いることも汲み置きの水を用いることもあった。ゴール用のプラカップに入り口用の長方形の穴(2×4.5)をあけた(図2)。

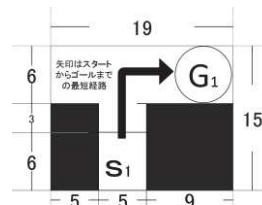


図1. 実験用バット



図2. ゴールカップ

#### 2-1-2. 実験2の研究試料

ハンドリングの負担を減らすため、飼育水槽でT字路実験が行えるよう浴室用接着剤で、水槽内に透明アクリル板で仕切りを設置した(図3)(以後実験水槽とよぶ)下図塗りつぶしたところがスタートゲートで、ゼブラフィッシュは水面近くを泳ぐので、予備実験の時よりも、容易にスタートができるようになった。また、T字路からは餌が見えないようになっている。ゼブラフィッシュは、今まで実験に参加したことの無い個体を用いた。餌はすり潰した人工飼料をもちいた。

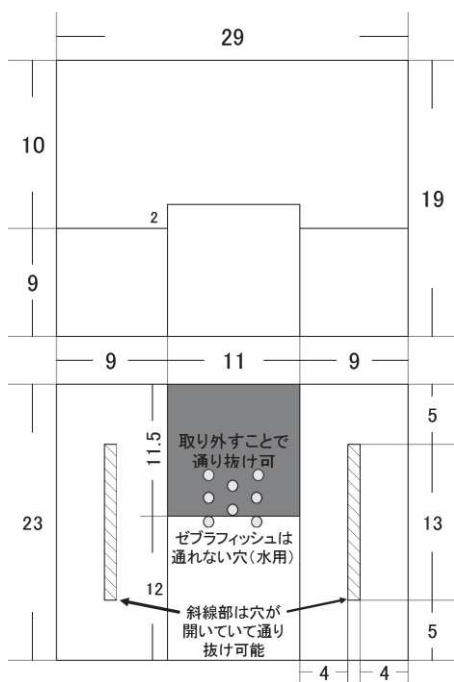


図3. 実験用水槽を上から見た図(上)と前から見た図(下)

## 2-2. 研究方法

### 2-2-1. 実験1

餌がゴールカップ内にあるので、実験用バットの水位はゴールカップの穴がすべて水中になるようにして、餌が漂っていないようにした。飼育用水槽から網ですくい、カップに入れておいたゼブラフィッシュを図1のS<sub>1</sub>のエリアに入れた。入れると同時に時間を計り始めた。ゼブラフィッシュがG<sub>1</sub>のゴールカップに入り、餌を食べると計測終了。餌を食べたらカップごと引き上げて飼育用水槽と別の水槽に他の個体の試行が終わるまで入れていた。最初の数日間は飛び跳ねてバットから飛び出ることがあるので、水槽の蓋などをのせていた。これを6/2(金)~6/21(水)の平日14日間1日1回12:45頃から12個体すべてに対して行った。

### 2-2-2. 実験2

#### 2-2-2-1. 実験方法

実験を始める前の週の最終平日(10/6, 10/20, 11/2)に飼育用水槽(60cm水槽)に28個体(2回目, 3回目は前回の実験に参加した5個体を除いた23個体)いる中から無作為に5個体をすくい実験用水槽の飼育スペースに入れ、実

験開始まで(2~3日)慣れさせた。試行前に蓋を開け、水位がゴール入り口の切れ目の上端に合うように水を足し、スタートから見て右側に餌を入れた。三脚で水槽を最初の数日間は真正面から、それ以外は真上からとれるようにビデオカメラを設置し、録画開始。スタートゲートを開けると同時に、タイムの計測を開始する。ゴールに入るまでの時間を5個体分記録し、平均を出した。この時ストップウォッチを止めると後の個体の計測ができないので、ゴールに入った瞬間にストップウォッチを見て確認していた。試行の後いろいろな場所に散らばっているゼブラフィッシュを取り外した透明アクリル板で追い込むか網ですくうかして飼育用エリアにもどす。10/10(火)~10/20(金)の9日間をα群, 10/23(月)~11/2(木)の9日間をβ群, 11/6(月)~11/17(金)の10日間をγ群としてこれを3群に行った。

#### 2-2-2-2. ビデオの解析方法

実験時にとったビデオを見て図4の左右の点線部を矢印の向きに通り越した回数を数える。個体識別をせずに、グループごとの合計でとる。ゴールした後の移動は回数に入れない。すべての個体がゴールするまで数えるのを基本とするが、ゴールしきることなく終了しているものについてはビデオの終了とともに終了とする。また、途中で見えなくなっているものについては、見えていない間の移動は数えない。

右向きに点線部を超えた回数を右の回数, 左向きに点線部を超えた回数を左の回数, 右の回数と左の回数との和を移動した回数とする。左の回数/移動した回数を左の割合とする。また、ゴールエリアと対称の位置にあるエリアに入った回数も数えたが、ほとんどの日で0であり、25日間で6個体しかいなかった。

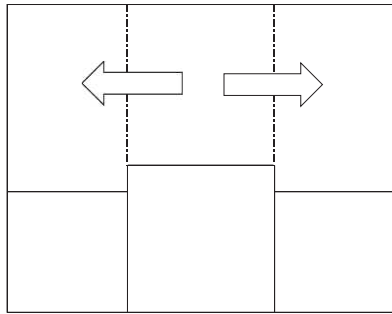


図4. 実験用水槽を上から見た図

(実線部がアクリル板の仕切り板で、点線部を境界としてみた。(仕切りなどがあるわけではない。))

### 3. 結果

#### 3-1. 実験1



図5. 12個体の平均タイムの変化

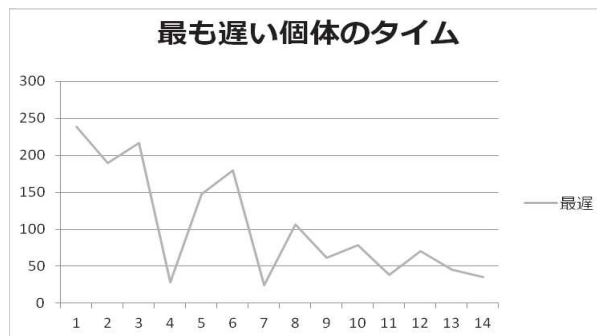


図6. 最も遅い個体のタイム

図5を見ると、所要時間は最初の1週間は変動するが、それ以降は安定する。2週間で変動がほぼなくなるが、記録が安定しても迷わずにゴールするということなく、迷っている時間が短くなるのみである。また、5、6日目に平均タイムが再上昇しているのは、一番遅かった個体と二番目に遅かった個体とで、平均タイムを15秒も引き

上げているからである。さらに、図6の最も遅い個体のタイム(最も遅い個体がゴールできておらず記録の取れていない日は次に遅い個体のタイム)は平均タイムの収束に比べると時間がかかった。

#### 3-2. 実験2

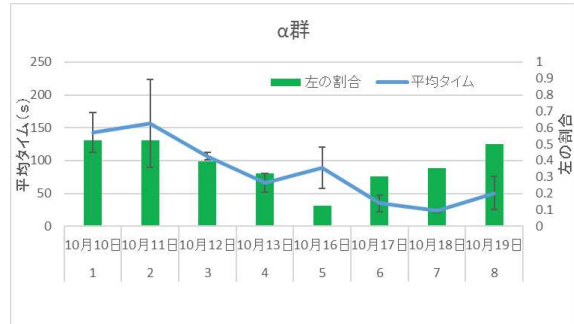


図7-1. α群の平均タイムと左の割合の推移

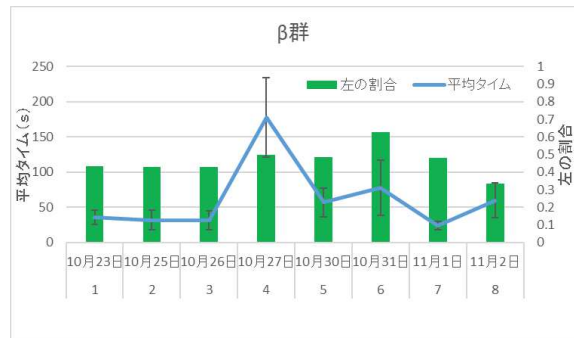


図7-2. β群の平均タイムと左の割合の推移

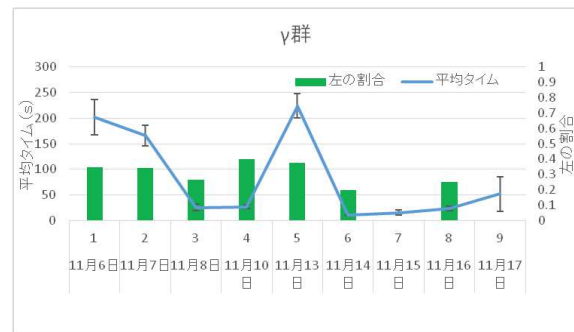


図7-3. γ群の平均タイムと左の割合の推移

図7よりα群では平均タイムが縮まり、最初の5日間で左に行く割合も下がり、γ群で左に行く割合が下がり、平均タイムは、5日目を除いて3日目以降1、2日目よりかなり短くなっているようにもみられる。しかし、α群における左に行く割合は、6、7、8日目にかけて上昇し、β群では、平均タイムが縮まる傾向も、左に行く割合が低くなる傾向も見られない。γ群では、一日も左に行く割合が5割

を超えることはなく、5日目の突出した平均タイムを除くと  $\alpha$ ,  $\beta$  群よりもかなり成績が良いようにも思われる。 $\gamma$  群の 5 日目に平均タイムが急上昇しているのは、スタートゲートが開いたことに気がつかなかったのか、タイムを計測開始しても飼育エリアにとどまり続け、160 秒ごろまで飼育エリアを出ることすらなかったからである。

#### 4. 考察

実験1では、タイムがはじめに比べてかなり縮まったが、実験2では、タイム・左の割合ともに学習の効果があつたともなかったともはっきりとはいえない結果となった。

実験1と実験2の違いを考えると、実験1にあつた右を覚えたからということ以外のタイムが縮まった理由として考えられるものは次の 4 点が挙げられる。

##### ・ハンドリング

試行前に飼育用水槽から網ですくい実験1では試行前にしばらくプラコップに入れていた。このときパニック状態になっているものもあつた。回数を重ねるにつれ、プラコップに慣れて、落ち着いた状態で T 字路に臨めるようになったのでタイムが縮まったのかも知れなかった。実験2では、試行前のハンドリングがなかった。

##### ・見た目の違い

実験1では T 字路から右にしかないプラカップが見えていたので景色を覚えたのかも知れないが、実験2では T 字路を曲がって進まないとい餌が見えない。また、左右対称の構造になっている。

##### ・スタートが難しい

実験1ではスタートゲートは下が 1cm 程度空いているだけだったので苦労していて覚える必要がありそうだったが、実験2では、上が 10 センチ以上空いていた。ゼブラフィッシュは、水面近くを泳ぐので、実験2では格段にスタートがしやすくなった。

##### ・水位

実験1では水位が一定でなく、水位が高いときは、

ゴールカップの穴から入る時に水面から深く潜らなければならず、ゴールに入るのに手間取ったが、水位が低いときは、水面を泳いだまま比較的すんなりとゴールカップに入ることができた。実験2では水位を必ず通る穴の上ぎりぎりに調整していたので、難易度が変わることはなかった。

しかし、

##### ・ゴールが難しかった

どちらにおいてもゴール手前にたどり着いているのにゴールに入れないということが頻繁に見られた。これを覚えたことによりタイムが縮まったのかも知れない。

等の問題は依然として残っている。また、匂いについては、実験開始前の飼育期間から同じ餌を食べていたので、匂いにひかれていた可能性はあるが、匂いを覚えたからタイムが縮まった可能性は低いだろうと考えられる。

また、実験2の  $\gamma$  群匂いて他の 2 群より成績が良かったように思われるのは、ただ単なる偶然かも知れないが、 $\alpha$  群として学習済みの個体が含まれていたことや、 $\alpha$  群として学習済みの個体が他の個体に教えていたのかも知れない。

#### 5. まとめと今後の課題

$\alpha$  群と  $\gamma$  群では平均タイムと左の割合には正の相関関係があるようであるが、 $\beta$  群ではあまりそのような傾向が見られなかった。そこで、平均タイムと左に行く割合の相関係数を出してみると、0.23 しかなく、相関は非常に弱かった。平均タイムと左に行く割合に相関が認められなかったのも、これらの評価方法のうち少なくともどちらか一方は不適切であったのではないかと思われる。また、ビデオがきちんと録れていなかった日がしばしばあつた。

試行前のハンドリングは軽減できたが、試行後にハンドリングの負荷があつたことに変わりない。また、スタートも簡単にはなつたが、スタートせずに飼育エリアにとどまり続けることがあつた。ゴールは簡単になつたとは言い難く、改善の余地が

ある。T字路から餌は見えなくなっているが、匂いはしていたかも知れない。

さらに、実験2では3群分のデータがあるが、実験1では1群分のデータしかなかったので、実験1のデータをもう少し集めたい。

加えて、どの群においても、かなり日が経っても多くの時間がかかっている個体がいるが、どちらの実験でも、これが特定の個体であるのか、そうでないのかが特定できなかったため、個体を識別して実験を行ってみたい。

## 6. 謝辞

京都大学情報学研究科知能情報学専攻生体情報処理分野前川真吾先生には、ゼブラフィッシュの飼育方法や研究の進め方などについて、ご助言いただきました。京都大学理学研究科動物行動学教室酒井理さんにはデータ処理方法などについて教えていただきました。

## 7. 参考文献

- マリアン・S・ドーキンス著 黒沢令子訳, 2015年, 動物行動の観察入門, 株式会社白揚社,
- 濱嶋渉, 2000, メダカを使った「動物行動」の教材化の工夫, 神奈川県立教育センター研究集録, 19, 57~60

# 安いお肉を柔らかく！？

## ～ 電気泳動で見るタンパク質分解酵素の力 ～

上田有希 大橋歩実 三木凜音

### 要旨

電気泳動を用いることで、タンパク質の大きさの識別をすることができるということを知り、興味を持った。電気泳動でタンパク質分解酵素の働きを調べることができるのではないかと考えた。電気泳動を通して肉に含まれているタンパク質を果物などに含まれているタンパク質分解酵素が分解する様子を観察することにした。本研究では電気泳動の方法として、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いた。タンパク質分解酵素を含む果物にはパイナップル、キウイ、パパイヤを用い、肉を漬け込む果物、果物に漬け込む時間、果物に漬け込む温度、漬け込む肉の大きさ、の条件を変えて3つの実験を行った。ゲルのバンドの様子から、肉の表面積を大きくし、タンパク質分解酵素を含む果物の中でもキウイに長時間漬け込むことでタンパク質の分解がよく進むことが分かった。

### 1. はじめに

私たちは電気泳動を用いることでタンパク質の大きさの識別ができることに興味を持った。多くの食品は種類ごとにそれぞれ様々な種類のタンパク質を含んでいる。事前に行った予備実験では、食品の種類ごとにタンパク質の構成のパターンが異なると考え、身近な、タンパク質を多く含んでいると考えられる10種類の資料(牛肉、豚肉、鶏肉、カラスガレイ、卵、牛乳、きなこ、納豆、爪、髪の毛)を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析した。その結果、試料の種類ごとに観察できたタンパク質の泳動パターンには、大きな差が認められなかった。

そこで本研究では、比較的個体ごとの質に差が小さく、より実用的な結果が得られると考えた鶏肉を用いてタンパク質分解酵素を持つといわれる食品で、どのようにタンパク質が分解されるかについて実験を行った。実験により、効果的な処理方法や、適するタンパク質分解酵素がわかれば、人々がおいしいと感じるように肉をやわらかく調理できると考えた。肉のタンパク質分解酵素を含む食品としては、パパイヤ、パイナップル、キウイを

用いた。パパイヤにはパパイン、パイナップルにはブロメライン、キウイにはアクチニジン(アクチニジン)というタンパク質分解酵素が含まれている。果物ごとに肉を漬け込む時間を変えることで、「果物の種類や漬け込んだ時間に応じて肉のタンパク質が分解される様子に変化が見られる」と仮説を立て、以下の実験を行った。

### 2. 材料・研究方法

#### 2-1. 研究試料

- ・鶏ささみ(スーパーで購入):実験ごとに1cm角に切ったもの、あるいはミキサーで細かくしたものをを用いた。
- ・果物(タンパク質分解酵素を含むもの):パイナップル、キウイ、パパイヤ
- ・30% w/v% アクリルアミド/ビス混合液(37.5:1)(和光純薬)
- ・試料用緩衝液(2ME+)(×2)(和光純薬)
- ・10w/v% ペルオキシ二硫酸アンモニウム(和光純薬)
- N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアンミン(和光純薬)



・電気泳動用緩衝液(Tris, グリシン, SDS, 滅菌水・自作)

#### 実験 1

鶏ささみを1cm角に切ったもの(約 5g)を、時間と温度を変えてパイナップルに漬けた。パイナップルはおろし器でおろして実と果汁を合わせて、肉がすべてつかう程度使用した。

#### 実験 2

鶏ささみをミキサーで細かくし、時間を変えてパイナップルとキウイに漬けた。キウイはすりつぶしたもの、パイナップルはフードプロセッサーにかけたものを果実と果汁を合わせて、それぞれ肉がすべてつかう程度使用した。

#### 実験 3

鶏ささみをミキサーで完全に細かくしたもの、1cm角に切ったもの(約 5g)に分け、それぞれキウイ、パイナップルに漬けた。キウイ、パイナップルはどちらもミキサーにかけたものを果実と果汁を合わせて、それぞれ肉がすべてつかう程度使用した。

## 2-2. 研究方法

本研究では電気泳動の方法として、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いた。ゲルの作成および泳動は、『実験医学別冊 タンパク質実験ハンドブック』p56~59の方法を参考にし、分離ゲル濃度を15%として行った。15%の分離用ゲル溶液の組成は、以下の通り。

・分離用ゲル溶液の組成(泳動版 2 枚分)

30%アクリルアミド/ビス混合液	7. 5ml
1. 5M Tris-HCl(pH8. 8)	3. 75ml
10%SDS	0. 15ml
DDW	3. 6ml
Total	15ml

試料(約 0. 1g)に滅菌水とサンプル調整用バッファをそれぞれ 50  $\mu$ l ずつ加えて処理した。処理したサンプルは 10  $\mu$ l を各レーンにアプライした。また、すべての泳動で、2 枚のゲルを使用したため、泳動時の電流は、濃縮時に 40mA、分離時

は、60mAとした。

ゲルの染色は、CBB Stain One Super(Nakarai Tesque)で行った。

分子量マーカーとして BSA(66296Da), OVA(42699Da), HEL(14314Da)を用いた(府立大学織田研究室作成)を同時に泳動した。

実験 1 では、漬けた時間(温度は常温) 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 分と、温度(漬けた時間は 20 分) 100 度、冷蔵状態、冷凍状態を変えてそれぞれの泳動パターンを比較した。無処理の鶏ささみも用意し、これらとマーカーを電気泳動し、染色した。

実験 2 では、漬けた時間(温度は常温)は 3, 5, 15, 30, 60 分, 18 時間とする。これらと、パイナップルのみ、キウイのみ、鶏ささみのみ、マーカーを電気泳動し、染色した。

実験 3 では、漬けた時間はともに 15 分, 30 分, 1 時間とする。これらと、キウイのみ、パイナップルのみ、細かくした鶏ささみのみ、カットした鶏ささみのみ、マーカーを電気泳動し、染色した。

## 3. 結果と考察

実験 1: 鶏ささみをパイナップルに漬けた時間、温度の影響

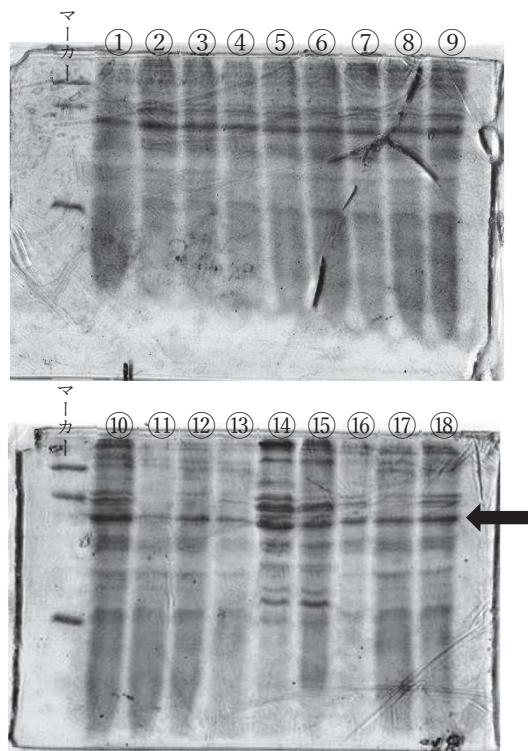
漬けた時間を変化させた場合、温度は常温、温度を変化させた場合の漬けた時間は 20 分とした。

①3分, ②5分, ③10分, ④15分, ⑤20分, ⑥25分, ⑦30分, ⑧35分, ⑨40分, ⑩45分, ⑪50分, ⑫55分, ⑬60分, ⑭処理を施さない, ⑮100度, ⑯冷蔵, ⑰冷凍, ⑱20分漬けたもの, である。

結果から、未処理の肉と 3 分間パイナップル液に漬けた肉を比べると、3 分間漬けたもので低分子量のスミアなバンドが、下の方に多く現れたことから、3 分間でも肉のタンパク質がパイナップルに含まれるプロメリンによって分解されていたと考えられる。しかし、3 分よりも長い時間漬けた肉のサンプルの下の方に出現したバンドは 3

分間漬け込んだ肉のサンプルの下の方に出たバンドよりも細くなっていた。これは、一度分解されたタンパク質が凝集したことによるものだと考えられる。また、何も処理してない肉のサンプルのバンドのうち太い一つ(←のところ、分子量約 37000 Da)が 50 分漬け込んだ肉のサンプルのところから急に薄くなっていることから、肉に含まれている矢印(←)のバンドのところにあったタンパク質(特定することはできていない)が、漬け込んで 45 分から 50 分の間で分解されたと考えられる。温度とタンパク質の分解の関係については、極端に温度を変化させた状態で漬け込んだ肉のサンプルと同じ時間常温で漬け込んだ肉のサンプルを比べると、前者の上の方にあるバンドが分解されずに残り、下の方に出たバンドが細くなっていたことから、極端に温度を変化させた状態で漬け込むとタンパク質の分解が進みにくいことがわかる。

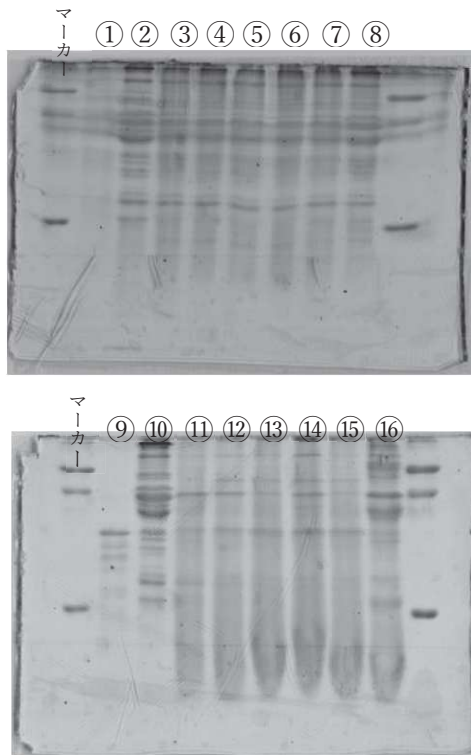
図1. 実験1のゲル



## 実験 2: パパイヤとキウイのタンパク質分解酵素の働きの違い

鶏ささみを②～⑧はパパイヤに、⑪～⑬はキウイに漬け込んだものである。①パパイヤ、②鶏ささみ、③3分、④5分、⑤15分、⑥30分、⑦60分、⑧18時間、⑨キウイ、⑩鶏ささみ、⑪3分、⑫5分、⑬15分、⑭30分、⑮60分、⑯18時間、である。結果から、パパイヤに3～60分漬け込んだ肉のサンプルのバンドは何も処理してない肉のサンプルのバンドと比べて変化は少なかったが、全体的に少しぼやっとしていることから、パパイヤに漬け込むことでパパイヤに含まれているパパインによって、少しではあるがタンパク質の分解が進んでいると考えられる。キウイに3～60分漬け込んだ肉のサンプルのバンドは未処理の肉のサンプルのバンドと比べて上の方のバンドが薄くなり、下の方のバンドが太くなっていることから、キウイに漬け込むことで、キウイに含まれているアクチニジンによって、肉のタンパク質が分解されたと考えられる。漬け込む時間の長さタンパク質の分解の関係は、キウイに漬け込んだ肉のサンプルは、漬け込む時間を長くするほど下の方に出るバンドが濃くなっていたのに対し、パパイヤに漬け込んだ肉のサンプルは、漬け込む時間が長くなってもバンドにあまり変化が見られなかったことから、パパインは漬け込み初めてすぐに分解がされてその後は分解がほとんど進まないのではないかと考えられる。一方で、18時間漬け込んだ肉のサンプルのバンドはキウイもパパイヤも、3～60分漬け込んだ肉のサンプルのバンドよりも明らかに上の方に出たバンドが太く残っていた。これは、この18時間漬け込んだ肉の試料だけ漬け込み終わるのがサンプル調整の直前だったため、試料ごとに漬け込み終わってからサンプル調整までの時間に大きくばらつきがあったことが原因なのではないかと予想した。

図 2. 実験 2 のゲル



実験 3：肉の形状，パイナップル(パイ)，キウイのタンパク質分解酵素の働きの違い。

鶏ささみをパイナップルとキウイに漬け込む。それぞれ漬け込む時間と漬け込む前の肉の処理の仕方（一方は 1cm 角の塊・もう一方はミキサーにかけた）を変化させた。

試料は次の表のように処理した。

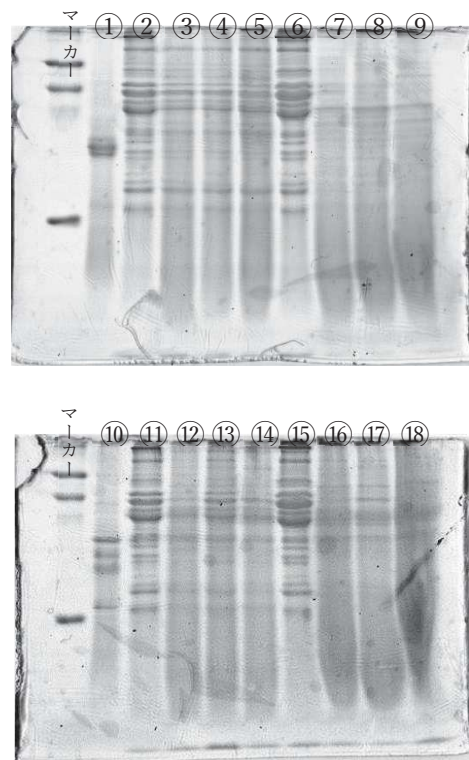
表 1：実験 3 の処理

酵素		時間	形状	
パイ	キウイ	分	1cm角	ミキサー
①	⑩	—	—	—
—	—	—	②⑪	—
③	⑫	15	○	
④	⑬	30	○	
⑤	⑭	60	○	
—	—	—	—	⑥⑮
⑦	⑯	15		○
⑧	⑰	30		○
⑨	⑱	60		○

②, ⑪は, 1cm 角の肉のみ(酵素なし), ⑥, ⑮は, ミキサーにかけた肉のみ(酵素なし)

結果から, 肉に施した処理の違いによって結果に変化が見られた。肉の形をそのまま残しながら処理を行ったサンプルのバンドは薄くなってはいるが, 読み取ることが可能である。それに比べてミキサーにかけ, 肉をかなり細かくして処理を行ったサンプルのバンドは読み取ることが難しいほど薄くなっていた。したがって, 肉をより細かくすることで肉と果物がふれあう表面積が大きくなり分解が進みやすくなるとわかる。果物別の分解の様子を観察すると形を残したサンプル, ミキサーにかけて細かくしたサンプルにおいていずれもわずかではあるがパイナップルによる分解よりキウイによる分解のほうがバンドの薄い部分が見られ, より進行していたことが読み取れる。ただ, 大きい変化はほとんど見られなかったことから果物による分解の様子には大きな違いがないことがわかる。

図 3. 実験 3 のゲル



#### 4. まとめと今後の課題

果物に含まれるタンパク質分解酵素が肉のタンパク質の分解に及ぼす影響について調べた。その結果, 肉をミキサーで細かくして行ったもの, 長時間肉と果物を触れさせたものがより明

らかな分解の様子をみせることがわかった。したがって、肉のタンパク質の分解をより進行させるには、肉と果物が触れる表面積を大きくし、分解を行う時間を長くすることが効果的であるといえる。この結果を日常生活に応用する際には、肉の表面積を大きくするために切り込みを入れることなどの工夫ができる。また、本実験では主にタンパク質分解酵素の働きを観察することに焦点を当てたので、今後は人が食べるということを視野に入れ、それに適した分解の時間や環境を調べていきたい。たとえば、肉を分解していく過程で固さの感じ方はどう変わっていくのかなど、人の感覚も同時に調べることができればより実用的な結果を得られるはずだ。

## 5. 謝辞

京都府立大学生命分子科学科生物物理化学研究室の織田昌幸准教授、TAの皆さんには研究期間を通して、同大学の実験室で本実験に関連する実験や講義を行っていただき、御助言を賜った。

## 6. 参考文献

竹縄忠臣, 2003, 実験医学別冊 タンパク質実験  
ハンドブック

## 9. 添付資料

図1～3のカラー写真である。

図1. 実験1のゲル

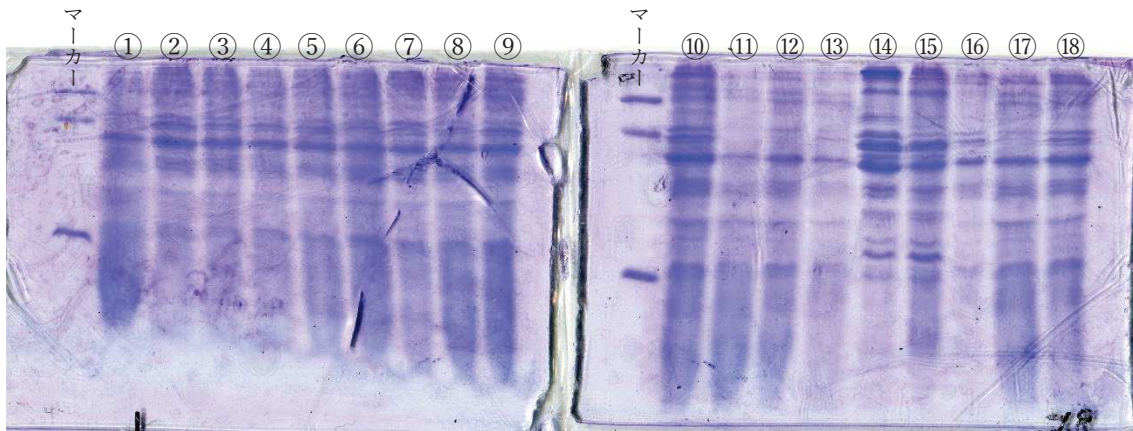


図2. 実験2のゲル

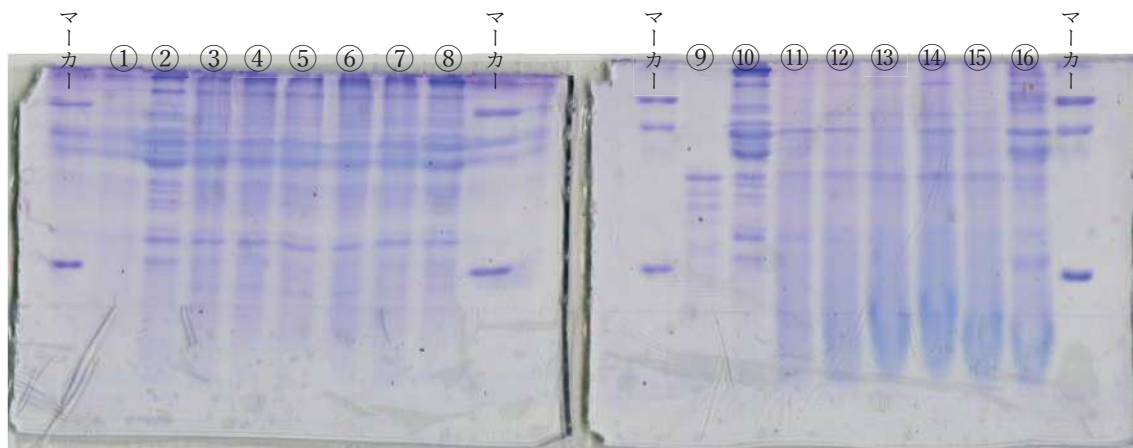
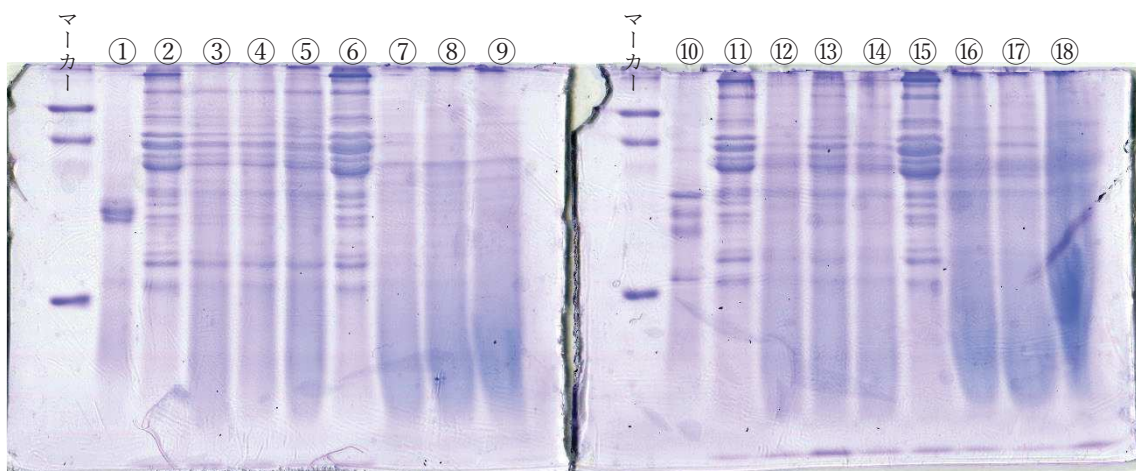


図3. 実験3のゲル



# 蚊の繁栄を防ぐ方法

## ～ ボウフラの pH 耐性 ～

井之川慎 喜多恭平 後藤健太郎

### 要旨

本研究では、蚊の新たな防除法を見つける手がかりを探すために、蚊の幼生(ボウフラ)の pH への耐性を測定した。また、ミナミヌマエビとの比較実験を行った。しかし、ボウフラの pH 耐性が強すぎたために、防除法への応用は難しいという結論に至った。

### 1. はじめに

蚊は夏場、産卵のために吸血し、私たちにかゆみや腫れなどかなりの被害をもたらす。この実験により蚊の新たな防除法を見つける手がかりが見つけられればという思いから実験を開始した。

pH3, 13 でヒトスジシマカの幼生(ボウフラ)は生存することができないが、pH4~11 の溶液に慣らすと pH3 と 12 でも耐性を示すということが分かっている。(Clank et al., 2004)そこで、本研究ではボウフラと pH の関係について調査した。そのため溶質についても調べることで、溶質の影響を排除した。私たちはボウフラの pH 耐性の強さを確認し、ボウフラが死亡する要因が溶質の影響ではなく pH の値に耐えられなかったからだということを確認した。また、同じ節足動物でボウフラよりもサイズの大きいミナミヌマエビを用いて同様の実験を行うことで pH 耐性を比較した。

### 2. 材料・研究方法

#### 2-1. 研究試料

本実験で使用したヒトスジシマカ(*Stegomyia albopicta*) のボウフラは 5/18 日洛北高校に設置した水槽、下鴨神社にあった防火バケツ、ミナミヌマエビ(*Neocaridina denticulata*)は 11/23 日に鴨川の水草の茂みから採集したものである。

氷酢酸  
水酸化ナトリウム

塩化ナトリウム  
pH メーター  
プラスチック試験管  
シャーレ

#### 2-2. 研究方法

1, 氷酢酸、水酸化ナトリウムを純水で希釈し pH 2.0~pH12.9 の溶液を調整した。

溶質	pH
CH <sub>3</sub> COOH	2.1
	2.4
	2.5
	2.9
	3
	3.2

溶質	pH
NaOH	9.5
	10.6
	12.2
	13

調整した各溶液に 4 齢のボウフラを 5 個体ずつ入れ観察した。例外として pH2.08、pH2.59、pH2.91 ではさらに 3 齢のものを 5 個体加えた。

2, pH13.8 の NaOHaq, pH2.1 の CH<sub>3</sub>COOHaq, それらを混ぜた pH6.0 の CH<sub>3</sub>COONaaq, CH<sub>3</sub>COONaaq と浸透圧が同じ 4.76mEp の NaClaq で先述のものと同様に比較実験を行い溶質の影響を確かめた。

3, ミナミヌマエビとの比較観察実験を行った。ボウ

フラの実験と同様に行ったが、各溶液に入れたエビは2個体である。

上記の実験はすべて被験体が完全に動かなくなった時点で死亡したと定義した。

### 3. 結果

#### 3-1. pH

酸性(ボウフラ)

pH	2.1	2.4	2.5	2.9	3.0	3.2
生死	×	×	×	×	×	○

塩基性(ボウフラ)

pH	9.5	10.6	12.2	13.0
生死	○	○	○	×

ボウフラが全滅したとき×, すべて生存し羽化したとき○と表中に表記した。

酸性下では pH3.0 以下, 塩基性下では pH13 以上では生存できなかった。

pH2.0, pH2.6, pH2.9 では 4 齢よりも 3 齢の方が早く死んだ。pH 耐性には個体差があり, 4 齢のボウフラは 3 齢のボウフラよりも強い耐性を示した。しかし、個体差は生残時間に差が出る程度である。

#### 3-2. 浸透圧

ボウフラが死ぬまでの時間(生残時間)

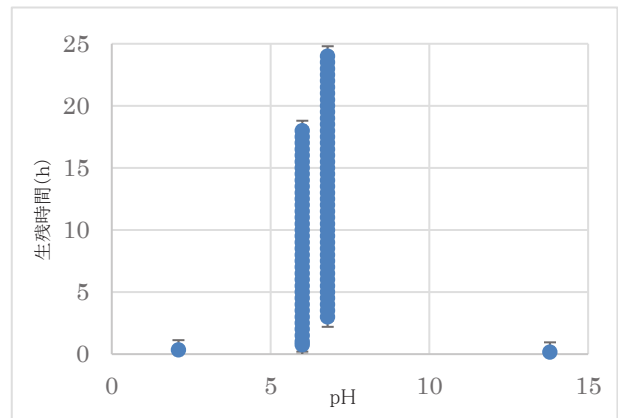
pH2.1 CH<sub>3</sub>COOHaq 19.5 分

pH13.8 NaOHaq 9 分

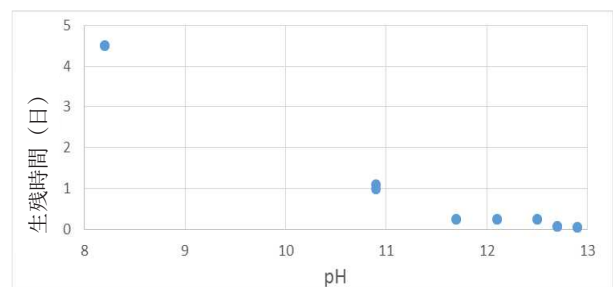
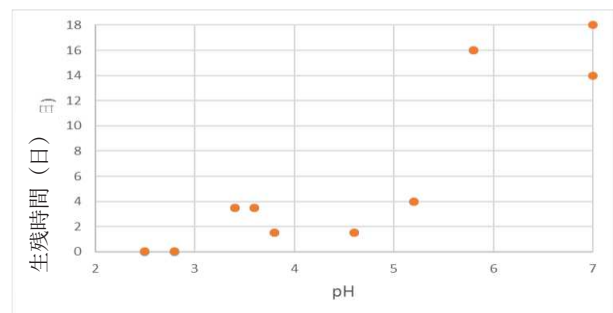
pH6.0 CH<sub>3</sub>COONaaq 45 分~18 時間

質量パーセント濃度 28% NaClaq 3~24 時間

CH<sub>3</sub>COONaaq, NaClaq については観察していない間に死亡したため結果がはっきりしていない。また, CH<sub>3</sub>COONaaq, NaClaq では死んだボウフラが半分程度に縮んだ。



#### 3-3. 結果 (ミナミヌマエビ)



酸性(ミナミヌマエビ)

pH	2.5	5.2	5.8
生死	×	×	○

塩基性(ミナミヌマエビ)

pH	8.2	10.9	12.9
生死	○	×	×

ミナミヌマエビの生残時間は塩基性環境 (pH>7) では, pH の上昇に依存して有意に短くなった(spearmanρ=-0.926, p<0.01, n=8).

また, 酸性環境 (pH<7) では, pH の下降に依存して有意に短くなった(spearmanρ=0.852, p<0.04, n=9). ミナミヌマエビはpH5.2 以下、pH10.9 以上では生残できなかった。

pH7 のイオン交換水では個体差はあるが 2 週

間生残した。そのため、それよりも生残時間が短い個体について溶液中の酸素濃度の低下によって死亡したわけではないといえる。

#### 4. 考察

ボウフラは予想通りのかなり強いpH 耐性をもっていた。これは呼吸時に水から酸素を取り込むエラ呼吸でなく尻にある呼吸管を空気中にだして呼吸しているため溶質を取り込む量が少ないからだ と推測した。また、溶質の影響は少なくpH の影響と比較すると微少なものとどまっていた。

それに対して、ミナミヌマエビは体サイズが大きいため強酸、強塩基に対しても一定時間は耐えられるが、エラ呼吸を行なっているため、ボウフラに比べて pH 耐性が弱かったと考えられる。

#### 5. まとめと今後の課題

以上のことから、ボウフラは高い pH 耐性を持っていることが分かった。そのため pH を変化させることによるボウフラの駆除は難しいと考えられる。そして耐性の高さは呼吸法に起因している可能性があるため、今後は同じような呼吸法の水生生物(ミズカマキリやハナアブの幼虫)で同様の実験を行い、考察の検証を行うとともに、ボウフラの弱点をさらに探りたい。

#### 6. 参考文献

Thomas M. Clark, Benjamin J. Flis, Susanna K. Remold, 2004, pH tolerances and regulatory abilities of freshwater and euryhaline Aedine mosquito larvae, The Journal of Experimental Biology 207, 2297-2304.